Aus der Abteilung für Zahnerhaltung
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. P. Riethe
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
und der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
des Hygiene-Instituts
Abteilungsleiter: Professor Dr. K. Botzenhart
der Universität Tübingen

ÜBER DIE MÖGLICHKEITEN DER BESTIMMUNG VON LEBENDZELLZAHL UND VIABILITÄT KARIOGENER MIKROORGANISMEN DURCH MESSUNG IHRES ATP-GEHALTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS STEINKE
aus Bad Hersfeld

1984

LIBRARY
LELAND
STANFORD
JUNIOR
UNIVERSITY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0013

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. P. Riethe
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
und der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
des Hygiene-Instituts
Abteilungsleiter: Professor Dr. K. Botzenhart
der Universität Tübingen

ÜBER DIE MÖGLICHKEITEN DER BESTIMMUNG VON LEBENDZELLZAHL UND VIABILITÄT KARIOGENER MIKROORGANISMEN DURCH MESSUNG IHRES ATP-GEHALTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS STEINKE
aus Bad Hersfeld

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. P. Riethe
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Botzenhart

gewidmet
meinen Eltern

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Dr. P. Riethe für die Überlassung des Themas und seine tatkräftigen Bemühungen, diese Arbeit in jeglichen Belangen zu unterstützen.

Herrn Professor Dr. K. Botzenhart sei für die Überlassung des Biolumineszenzmeßgerätes und seine gedanklichen Anregungen gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Biochem. L. Netuschil, der mich in die Problematik der Mikrobiologie der Plaque einführte, mir bei der Durchführung der Versuche behilflich war und in dem ich jederzeit einen fachkundigen Gesprächspartner zur Diskussion aller Aspekte fand.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1.	Zur Kariesätiologie und -prophylaxe	1
1.2.	Adenosintriphosphat (ATP) als Meßgröße für einen Lebensnachweis	3
1.3.	Problemstellung	4
2.	SCHRIFTTUMSÜBERSICHT	6
2.1.	Die biochemische Bedeutung von ATP	6
2.2.	Entwicklung der ATP-Messungen mit Hilfe der Biolumineszenz	8
2.3.	Der ATP-Pool pro Bakterieneinheit	10
2.4.	Der Adenylate Energy Charge und die Lebensfähigkeit	12
2.5.	Fluoridwirkungen auf Bakterien	13
3.	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1.	Bakterien und Kulturmedien	16
3.2.	Bestimmung der optischen Dichte	17
3.3.	Konventionelle Zellzahlbestimmungen	17
3.4.	ATP-Messungen mit Hilfe der Biolumineszenz	18
3.4.1.	Reagentien der Biolumineszenzreaktion	18
3.4.2.	Meßvorgang	19
3.4.3.	Berechnung der ATP-Menge aus den RLU	20
4.	METHODISCHER TEIL DER DISKUSSION	22
4.1.	Meßgenauigkeit und Fehlerabschätzung	22
4.2.	Minimaler Grenzwert der Messung	24
4.3.	Extraktionsmethode	26
4.4.	Inhibitoren der Biolumineszenzreaktion	27
4.5.	Nichtbakterielles ATP	28
4.6.	Referenzverfahren zur Ermittlung der Lebendzellzahlen einer bakterienhaltigen Probe	29

Seite

4.6.1. Plattierungsverfahren 29
4.6.2. Bakterienzählkammer 31
4.6.3. Vitalfärbungen 31
4.7. Zusammenfassung 32

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER ATP-MESSUNGEN BEI BAKTERIELLEN WACHSTUMS-ZYKLEN 33
5.1. Wachstumskurven von *Staphylococcus epidermidis* 33
5.2. Ergebnisse und Vergleich der ATP-Messungen mit Wachstumskurven von *Staphylococcus epidermidis* 38
5.3. Vergleich der Wachstumskurven von *Streptococcus mutans* 40
5.4. Beeinflussung des Wachstums und des ATP-Pools von *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus mutans* durch Natrium-fluorid 43

6. THEORETISCHE ERÖRTERUNGEN ZUM ATP-POOL 48
6.1. Das Wesen des ATP-Pools 48
6.2. Die Turnovertime des ATP-Pools 49
6.3. ATP-Umsatz und Syntheseleistung 54
6.4. Konsequenzen aus der im Sekundenbereich liegenden Turnovertime des ATP-Pools 55

7. REAKTIONEN DES ATP-POOLS ALS ANTWORT DER BAKTERIEN AUF MESSMANIPULATIONEN 57
7.1. Verdünnen von Bakterienkulturen: Auswirkungen auf den ATP-Pool 57
7.2. Verdünnungsexperimente in verschiedenen Medien 60

8. ALLGEMEINE DISKUSSION: MÖGLICHKEITEN DES EXPERIMENTELLEN EINSATZES DER BIOLUMINES-ZENZ 62

Seite

9. ZUSAMMENFASSUNG 65

10. LITERATURVERZEICHNIS 66

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Zur Kariesätiologie und -prophylaxe

Mikroorganismen der Plaque nehmen die mit der Nahrungs- und Genußmittelzufuhr des Menschen in der Mundhöhle angebotenen Substrate auf und produzieren durch ihren Stoffwechsel Säuren, die wiederum das anorganische Kristallgefüge des Zahnes auflösen. Dieser Vorgang spielt sich in bzw. unter der Plaque ab. Die Plaque wird als festsitzender, histologisch strukturierter Belag aus lebenden und toten Mikroorganismen, die in einer polysaccharid- und glykogenreichen Matrix eingebettet sind (AHRENS 1980), definiert.

Unter den karieserzeugenden Mikroorganismen sind besonders *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces naeslundii* zu nennen (NEWBRUN 1978, GEHRING 1981). Dabei muß beachtet werden, daß nicht allen Bakterienstämmen die gleiche Pathogenität zugesprochen werden kann.

Insbesondere scheint *Streptococcus mutans* im Kariesgeschehen eine besondere Rolle zuzukommen, da er die Möglichkeit besitzt, extrazelluläre Polysaccharide zu bilden (GEHRING 1981), die eine klebrige Konsistenz besitzen. Er ist damit als Initialbesiedler der glatten Zahnoberflächen besonders befähigt, da er sich mit Hilfe dieser Polysaccharide am Zahnschmelz festhaften kann. Auf diese Weise bietet er die Grundlage zur Bildung der Plaque und zur Ansiedlung weiterer Bakterien, die selbst nicht am Zahn haften könnten. Weitere Gesichtspunkte dieses Geschehens sind in den Übersichtsarbeiten von GUGGENHEIM (1974), BÖßMANN (1979) und RIETHE (1982) zu finden.

Aufgrund seiner besonderen Stellung in der Kariesätiologie ist *Streptococcus mutans* Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Aus diesem kurzen Überblick soll hervorgehen, welche Bedeutung den Mikroorganismen der Mundhöhle zukommt. Dabei ist

es von großem Interesse, aus geringen Plaquemengen die Anzahl lebender Bakterien und deren Aktivitätszustand zu bestimmen.

Es ist bekannt, daß bei prophylaktisch durchgeführten Fissurenversiegelungen die in der Tiefe der Fissur befindlichen Mikroorganismen von der Substratzufuhr abgeschnitten und so in ihrer Stoffwechselaktivität empfindlich gestört werden. Trotzdem können durch diese Maßnahmen nicht alle Mikroorganismen restlos abgetötet werden (NETUSCHIL 1981). Qualitative und quantitative Untersuchungen dieser Restpopulationen sowie die Erfassung ihres Aktivitätszustandes können weitere interessante Aufschlüsse über die Effektivität einer Fissurenversiegelung geben. Ähnliche qualitative und quantitative Fragestellungen ergeben sich beim prophylaktischen Einsatz von Fluoriden, deren Karies-protektive Wirkung zwar hinlänglich bekannt, aber nicht im Detail, wie beispielsweise der Wirkung des Fluorids in verschiedenen Formen und Konzentrationen auf den Stoffwechsel der sich in der Plaque befindlichen Bakterien, geklärt ist.

Herkömmliche mikrobiologische Untersuchungsmethoden erweisen sich bei entsprechenden Untersuchungen der Plaque als nicht optimal (ROBRISH et al. 1978, 1979; KEMP 1979). BÖßMANN (1979) gibt an, daß nur 10-20 % der Plaquebakterien überhaupt anzüchtbar sind. Parameter wie Naßgewicht, Trockengewicht, Gesamtstickstoffgehalt oder die optische Dichte einer Flüssigkeitskultur geben keinen Aufschluß über die Anzahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen der Plaque (MAURER 1981). Es liegt deshalb nahe, von eben diesen Parametern unabhängige Meßmethoden einzusetzen - wie beispielsweise die ATP-Bestimmung als Hilfsgröße zur Klärung qualitativer und quantitativer Fragen.

1.2. Adenosintriphosphat (ATP) als Meßgröße für einen Lebensnachweis

Adenosintriphosphat (ATP) tritt in allen lebenden Zellen als Energieträger auf (HUENNEKENS und WHITELY 1960). Da es sehr schnell umgesetzt wird (HARRISON und MAITRA 1969), wird es in toten Zellen rasch abgebaut. Damit eignet es sich ausnehmend gut zur Lebensbestimmung. Dieses Phänomen macht sich die NASA zunutze, möglicherweise vorhandenes außerirdisches Leben nachzuweisen (SELIGER 1973).

Mit der erstmalig von STREHLER und TROTTER 1952 eingeführten Methode der Biolumineszenz lassen sich geringe Mengen von ATP nachweisen. Unter Biolumineszenz versteht man eine in der belebten Natur vorkommende chemische Reaktion, bei der Licht frei wird. Paradebeispiel ist hierbei das Glühwürmchensystem. Die Lichtmenge, die in der Biolumineszenzreaktion frei wird, läßt sich mit einem Photomultiplier quantitativ erfassen.

Mit dieser Methode läßt sich eine Lebendzellzahlbestimmung durchführen, indem man den ATP-Gehalt einer zellhaltigen Probe, bezeichnet als *ATP-Size*, durch den ATP-Gehalt einer einzelnen Zelle, bezeichnet als *ATP-Pool* (FORREST 1965), dividiert (vgl. 2.3.). Voraussetzung für diese Art der Lebendzellzahlbestimmung ist die Annahme eines konstanten ATP-Pools pro Zelle. Diese Überlegungen gelten für jegliche Zellen, im folgenden sollen jedoch eukaryontische Zellen außer Betracht gelassen werden.

Die Säureproduktion von Mikroorganismen insbesondere beim Abbau von Kohlehydraten ist durch den Embden-Meyerhof-Cyclus stöchiometrisch mit der Gewinnung des Energieträgers ATP verbunden. Es liegt daher nahe, aufgrund der synthetisierten ATP-Menge auf die Stoffwechselaktivität der kariogenen Mikroorganismen zu schließen.

Läßt sich von dem ATP-Pool via Stoffwechselaktivität auf die Viabilität - und damit im speziellen Falle auch auf die Kariogenität - von Bakterien schließen?

Schon an dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, daß beide Fragestellungen einander ausschließen: die Lebendzellzahlbestimmung setzt einen konstanten, die Viabilitätsbestimmung einen sich verändernden ATP-Pool voraus.

1.3. Problemstellung

Es soll untersucht werden, unter welchen Bedingungen der Einsatz von Photomultipliern zur quantitativen Verfolgung der Biolumineszenzreaktion die Messung des ATP-Gehaltes von Mikroorganismen gestattet und welche Aussagen aufgrund dieser Messungen möglich sind -

erstens im Hinblick auf die Lebendzellzahlbestimmung,

zweitens bezüglich der Viabilität der Mikroorganismen.

Verschiedene Versuchs- und Wachstumsbedingungen für die Mikroorganismen werden dabei zu berücksichtigen sein.

Wenn in dieser Arbeit von Viabilität der Mikroorganismen die Rede ist, so ist primär nicht der bei Bakterien oftmals schwer abschätzbare Übergang von gerade noch lebensfähig zu tot gemeint, sondern - vornehmlich auch im Hinblick auf die Kariesätiologie - das Maß der Stoffwechselleistung, speziell auch die Aktivität der Glycolyse und der ATP-Synthese, verbunden mit der Fähigkeit zur Zelliteilung und zum Wachstum sowie - insbesondere bei kariogenen Mikroorganismen - der Säureproduktion.

Für Vergleichsmöglichkeiten wurden *Streptococcus mutans* als Vertreter der kariogenen, *Staphylococcus epidermidis* als Vertreter der ubiquitär vorkommenden Mikroorganismen ausgewählt.

Die Kariesprophylaxe durch Fluoride ist unumstritten, die Beeinflussung der Viabilität durch verschiedene Fluoridkonzentrationen im Zusammenhang mit der Biolumineszenz soll dargestellt werden.

Neben theoretischen Aspekten sollen methodische und apparatetechnische Grenzen im Hinblick auf die Praktikabilität der Untersuchungsmöglichkeiten nicht unberücksichtigt bleiben.

2. SCHRIFTTUMSÜBERSICHT

2.1. Die biochemische Bedeutung von ATP

Die Struktur von ATP wurde erstmalig 1929 von FISKE und SUBBAROW angegeben, 1941 postulierte LIPMAN die zentrale Bedeutung des ATPs im Energiestoffwechsel.

ATP ist ein Nukleotid, aufgebaut aus der Base Adenin, dem Zucker Ribose und der Phosphorsäure, die in 5-Stellung der Ribose mit der OH-Gruppe verestert ist. An der Phosphorsäure sind anhydridartig zwei weitere Phosphorsäuren angeknüpft.

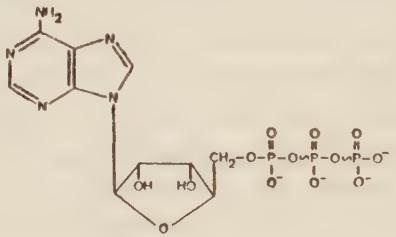


Abb. 1: Adenosintriphosphat (umgezeichnet aus LEHNINGER 1974). Symbol ∿ kennzeichnet energiereiche Bindungen

ATP enthält zwei energiereiche Bindungen, es besitzt ein hohes Gruppenübertragungspotential. Je nachdem, welche Gruppen übertragen werden, kann ATP folgende Reaktionen eingehen (KARLSON 1977):

- Übertragung des Orthophosphatrestes, Abspaltung von Adenosindiphosphat (ADP)
- Übertragung des Diphosphatrestes, Abspaltung von Adenosinmonophosphat (AMP)
- Übertragung des Adenosylmonophosphatrestes, Abspaltung von Pyrophosphat (PRPP)

- Übertragung des Adenosylrestes, Abspaltung von Orthophosphat und von Pyrophosphat

Die Fülle der Reaktionsmöglichkeiten der Adeninnukleotide kann in der lebenden Zelle in drei Gruppen eingeteilt werden (CHAPMAN und ATKINSON 1977):

- als Intermediatprodukte in der Biosynthese von Nukleinsäuren, Cofaktoren wie Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP), Flavinadenindinucleotid (FAD), Coenzym A
- als Bestandteile eines Energieübertragungssystems, das stöchiometrisch alle Prozesse koppelt
- als Regulatoren der Aktivitäten vieler enzymatischer Reaktionen über kinetische Steuerungsvorgänge

Einen Überblick über die ersten beiden Reaktionstypen gibt folgendes Schema:

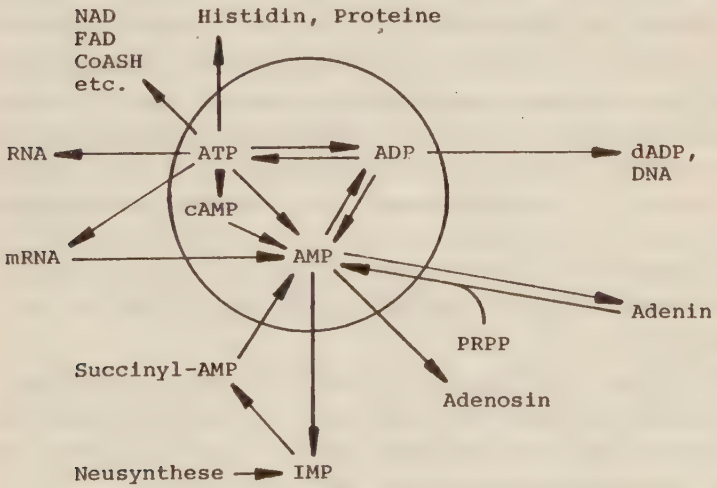


Abb. 2: Reaktionswege des ATP in der Bakterienzelle (umgezeichnet nach: SWEDES, unpubliziert, aus CHAPMAN und ATKINSON 1977)

Dabei sind ATP, ADP und AMP durch die Reaktion der Adenylatkinase verbunden, die Regeneration von ATP aus ADP geschieht durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette und dem Citronensäurecyclus oder anaerob über die Seitenkettenphosphorylierung des Embden-Meyerhof-Cyclus.

2.2. Entwicklung der ATP-Messungen mit Hilfe der Biolumineszenz

Neben der quantitativen Bestimmung von ATP mit Hilfe von Ionenaustauschern, Papierchromatographie und enzymatischen Reaktionen tritt in neuerer Zeit die 1952 von STREHLER und TROTTER entwickelte Methode der Biolumineszenz in den Vordergrund. Dabei wird die chemische Energie des ATPs in der gleichen Biolumineszenzreaktion, die auch das Glühwürmchen (Photinus pyralis) zur Erzeugung seines Kaltlichtes benutzt, enzymatisch in Photonen übergeführt, deren Menge mit dementsprechend empfindlichen Photometern gemessen werden kann.

Wird bei chemischen Reaktionen ein Teil der freigesetzten Energie als Licht frei, so spricht man von Chemolumineszenz, findet diese Reaktion in lebenden Organismen statt, bezeichnet man sie als Biolumineszenz. Unter Luziferasen versteht man Enzyme, die Biolumineszenzreaktionen katalysieren, unter Luziferinen Substrate, die in der Biolumineszenzreaktion Produkte im elektronisch angeregten Zustand bilden (WULFF 1982).

GREEN und MC ELROY gelang es 1956, das Enzym Luziferase, BITLER und MC ELROY 1957, das Substrat Luziferin aus Glühwürmchenextrakt zu isolieren. WHITE et al. gaben 1961 eine chemische Synthesemöglichkeit für Luziferin an.

SELIGER und MC ELROY klärten 1960 die Lumineszenzreaktion in ihren Grundzügen auf, dargestellt in dem Reaktionsschema der Abb. 3. Da sich die Luziferine und Luziferasen einzelner Reaktionssysteme evident unterscheiden, sind die Ein-

zelreaktionen noch nicht vollständig aufgeklärt; einen Überblick darüber geben CORMIER et al. (1973), DE LUCA und MC ELROY (1978) und DE LUCA et al. (1979).

$$\text{Luziferase} + \text{Luziferin} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{++}}$$

$$\text{Luziferase-Luziferin-AMP} + \text{Pyrophosphat}$$

$$\text{Luziferase-Luziferin-AMP} + O_2 \longrightarrow$$

$$\text{Luziferase} + \text{Oxiluziferin} + \text{AMP} + CO_2 + \text{Photon} (\lambda \text{ max. } 562\text{ nm})$$

Abb. 3: Biolumineszenzreaktion

Anfänglich wurde das in der Biolumineszenz freigesetzte Licht mit Hilfe von umgebauten Flüssigkeitsscintillationszählern gemessen (TAL et al. 1964); eigens für die Biolumineszenz hergestellte Geräte beschreiben CHAPPELLE und LEVIN (1968), PICCIOLO et al. (1978) und KEMP et al. (1979).

Diese speziellen Meßgeräte bestehen aus einem Photomultiplier, der die Photonen der Biolumineszenzreaktion in elektrische Impulse umformt, daran angeschlossen sind ein Verstärker, ein Diskriminator, ein Integrator und die entsprechende Anzeigeeinheit (vgl. Abb. 4).

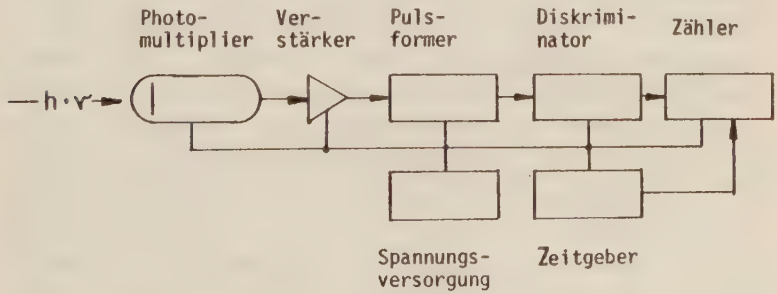


Abb. 4: Biolumineszenzmeßgerät (Funktionsschema nach WULFF 1982)

Übersichtsarbeiten über die Anwendung der Biolumineszenz sind bei SCHRAM (1973, 1974), SELIGER (1973), KOLEMAINEN (1979) und in den LUMAC Microbiological Applications (1979) zu finden.

Damit das intrazelluläre ATP einer Zelle überhaupt den sich außerhalb der Zellmembranen befindlichen Reagenzien der Biolumineszenz zugänglich gemacht werden kann, muß es vor der Messung artifiziell aus der Zelle herausgeholt werden. Weiterhin müssen sämtliche Reaktionen, die in den ATP-Pool der Zelle eingreifen, sofort unterbrochen werden, um einer Verfälschung des Meßergebnisses vorzubeugen. Untersuchungen dieser Extraktionsverfahren führen DHOPLE und HANKS (1973), SCHRAM (1973), KNUST et al. (1975) und RIEDL (1981) an.

SPIEGEL und TIFFT (1977) untersuchen die Stabilität der zur Biolumineszenz benötigten Reagenzien.

Eine kritische Auseinandersetzung mit der Meßmethode der Biolumineszenz liefern DHOPLE und HANKS (1973) und LUNDIN (1974).

2.3. Der ATP-Pool pro Bakterieneinheit

FORREST (1965) definiert den ATP-Gehalt einer durch ein bestimmtes Volumen festgelegten Bakterienprobe unabhängig von der Anzahl der sich in ihr befindlichen Bakterien als *ATP-Size*; den ATP-Gehalt pro Bakterieneinheit - als Bezugssysteme kommen infrage: pro Bakterium, pro Colony-Forming-Unit (CFU), pro optische Dichteeinheit, pro mg Naßgewicht, pro mg Trockengewicht, pro Proteingehaltseinheit etc. - als *ATP-Pool*. Durch die verschiedenen Bezugssysteme sind die einzelnen Angaben in der Literatur oft nicht vergleichbar. Zugleich ist aus ihrer Verschiedenartigkeit zu ermessen, welche Schwierigkeiten es macht, die Anzahl der lebenden Bakterien in einer Kultur zu bestimmen.

Ein kurzer Literaturüberblick über verschiedene gefundene Werte für den ATP-Pool ist bei HOBSON und SUMMERS (1972) zu finden.

D'EUSTACHIO und LEVIN (1967) und D'EUSTACHIO und JOHNSON (1968) geben für insgesamt 16 verschiedene Bakterienarten einen ATP-Pool von 1,45 - 10,3 fg ATP pro Bakterienzelle an, dessen Einzelwerte während einer Wachstumskurve maximal um das 1,4-fache schwanken. HARRISON und MAITRA (1969) ermitteln einen von der Wachstumsgeschwindigkeit weitgehend unabhängigen ATP-Pool bei *Klebsiella aerogenes*. FREESE et al. (1969) geben einen während des exponentiellen Wachstums konstanten ATP-Pool von 2×10^{-18} M ATP pro Bakterium bei *Bacillus subtilis* an. Demgegenüber weisen KLOFAT et al. (1969) bei dem gleichen Bakterium Schwankungen des ATP-Pools um den Faktor 3 nach. CHAPPELLE und LEVIN (1968) geben einen Abfall des ATP-Pools während des Wachstums an, ihre Werte schwanken zwischen 0,028 - 0,89 fg ATP pro Bakterium als Mittelwerte bei 19 verschiedenen Bakterienarten. FORREST (1965) zeigt bei *Streptococcus faecalis* weite Schwankungen des ATP-Pools ohne Auswirkungen auf die Wachstumsrate. COLE et al. (1967) geben für *Escherichia coli* je nach Kulturbedingungen eine Balance, eine Überproduktion, eine Unterproduktion oder eine oscillierende Abhängigkeit zwischen ATP-Pool und Wachstum an. HOLMS et al. (1972) zeigen bei *Escherichia coli*, daß zwischen Wachstum und ATP-Pool eine lineare Abhängigkeit besteht, deren Proportionalitätsfaktor von der Zusammensetzung der Kulturmedien abhängig ist. SHARPE et al. (1970) geben für verschiedene Bakterienzellzahlen einer Kultur unterschiedliche Werte für die Größe des ATP-Pools an. HAMILTON und HOLM-HANSEN (1967) zeigen für verschiedene Bakterienarten aus Meerwasserproben, daß ihr ATP-Pool während einer Wachstumskurve nicht konstant ist. Das gleiche bestätigen BUSH et al. (1975) für *Escherichia coli*. HÖJER et al. (1976) weisen in einem Diagramm auf eine nichtlineare Funktion zwischen Wachstum und ATP-Pool bei *Staphylococcus epidermidis* hin, auch finden sie keinen Zusammenhang zwischen ATP-Pool und Viabilität. Sie benutzen den ATP-

Pool zur Bestimmung von Doxycyclineinheiten, einen ähnlichen Weg beschreitet NILSON (1978) zur Bestimmung von Gentamicinkonzentrationen. Er gibt auch eine Fehlereinschätzung im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren an. LEE et al. (1971) zeigen die unabhängige Veränderung von ATP-Pool und Zellzahl und die Unabhängigkeit von ATP-Pool und Viabilität bei *Aerobacter aerogenes*.

RIEDL (1981) weist u.a. nach, daß der ATP-Pool von *Streptococcus mutans*, bezogen auf die optische Dichte, während einer Wachstumskurve nicht konstant und von der Vorbehandlung der Bakterienkultur abhängig ist. Verschiedene Serotypen von *Streptococcus mutans* zeigen in dieser Arbeit verschiedene Werte des ATP-Pools.

MAURER (1981) benutzt zur Lebendzellzahlbestimmung in menschlicher Plaque einen Durchschnittswert des ATP-Pools, ähnliche Verfahren wenden HOLM-HANSEN und Mitarbeiter (1966, 1969, 1972) und LEE et al. (1971) zur Lebendzellzahlbestimmung in Sedimenten an. Um via ATP-Size von Plaque, gewonnen an Affenzähnen, eine Lebendzellzahlbestimmung zu machen, drücken ROBRISH et al. (1978) die Bakterienzahl durch den ATP-Pool von *Streptococcus sanguis* in "Sanguis-Einheiten" aus, diesen ATP-Pool nehmen sie als konstant an.

2.4. Der Adenylate Energy Charge und die Lebensfähigkeit

Von einigen Autoren wird der Adenylate Energy Charge (AEC) als Maß für die Lebensfähigkeit einer Population oder eines Organismus angesehen. ATKINSON (1968) gab, ausgehend von enzymkinetischen Überlegungen, den AEC mathematisch folgendermaßen an:

$$AEC = \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Eine Literaturübersicht zu der praktischen Anwendung dieser theoretischen Überlegungen geben CHAPMAN und Mitarbeiter

(1971, 1977). Sie korrelieren einen AEC größer als 0,8 mit voll lebensfähig, einen AEC von 0,5 - 0,8 mit eingeschränkt lebensfähig, unterhalb eines AEC-Wertes von 0,5 ist bei *Escherichia coli* mit keiner Lebensfähigkeit zu rechnen.

KEMP (1979) mißt den AEC bei *Streptococcus mutans*, um über den AEC eine Viabilitätsaussage in der Plaque machen zu können. In Sterbekulturen erhält er Werte zwischen 0,084 und 0,014 für den AEC von *Streptococcus mutans*. Weitere Untersuchungen über den AEC liegen von ROBERTON und WOLFE (1970) und ROBRISH et al. (1979) vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann der AEC experimentell nicht bestimmt werden, da die labortechnischen Einrichtungen - computergesteuerte Biolumineszenzmeßgeräte (KEMP 1979) - dafür nicht vorhanden sind.

2.5. Fluoridwirkungen auf Bakterien

Interne als auch externe Fluoridapplikationen bewirken in klinischen Untersuchungen eine signifikante Reduktion der Karies (DEAN und Mitarbeiter 1941, 1942; MÜHLEMANN 1967; MARTHALER 1968; KÖNIG 1967, 1974, 1977a, 1977b; BÜTTNER 1978). Dabei sind neben der Beeinflussung der Säurelöslichkeit des Zahnschmelzes (GÜLZOW 1966) die Wirkung von Fluorid auf den Stoffwechsel der Plaque von Bedeutung. Insbesondere hemmt Fluorid die intrazelluläre Polysaccharidsynthese, hat Einfluß auf die Aktivität der Enzyme der Bakterien (CAPOZZI et al. 1967, IMFELD 1978, SAXER 1978 und BÖßMANN 1979) und stört die Glucosetransportmechanismen (KASHET et al. 1977). TIWARI und PANDEY (1978) beschreiben bei geringen Fluoridkonzentrationen eine gering stimulierende, bei höheren Fluoridkonzentrationen eine hemmende Wirkung in der Glycolyse.

CAPOZZI et al. (1967) geben als Angriffsorte der enzymatischen Hemmung durch Fluoride in der Glykolyse die Enzyme Phosphoglyceromutase und Enolase an (Abb. 5).

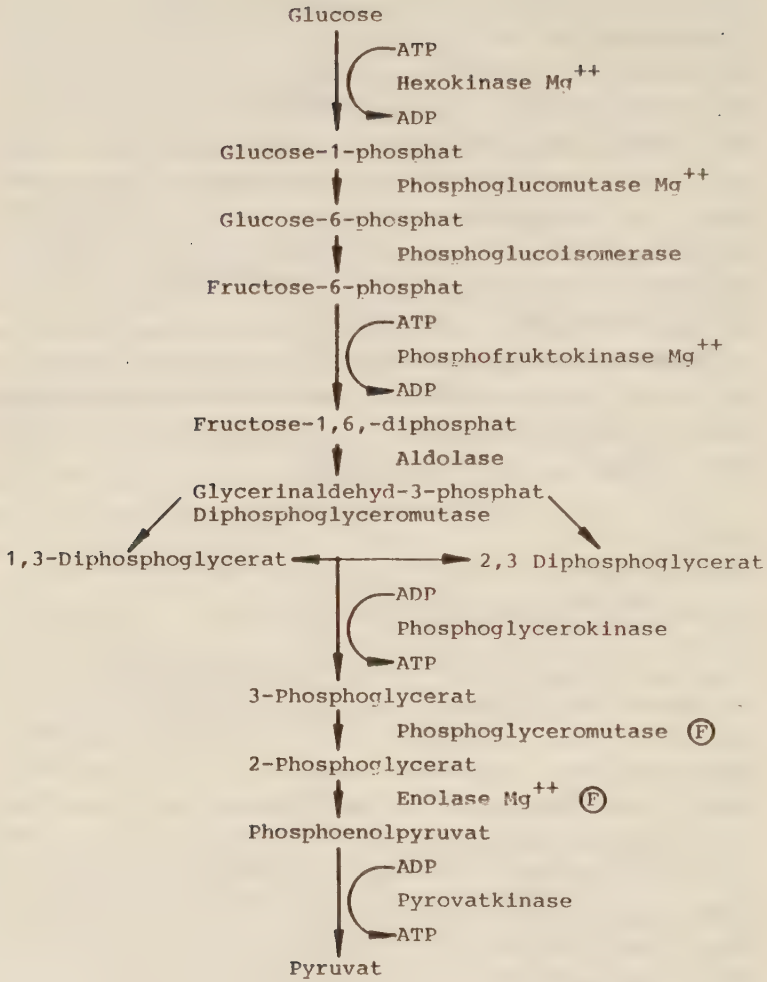


Abb. 5: Enzymatische Hemmung der Glycolyse durch Fluorid. Die Hauptangriffsorte sind durch (F) markiert (umgezeichnet aus CAPOZZI et al. 1967)

Die quantitative Hemmung von Bakterienwachstum und deren Lebensfähigkeit wird bei verschiedenen Fluoridarten und -konzentrationen von BEIGHTON und Mitarbeitern (1977, 1980), BROWN et al. (1980), OLSON et al. (1979), THIBODEAU und MARQUIS (1980) und YOON und Mitarbeitern (1980, 1981) beschrieben. SCHUSTER et al. (1981) gehen auf den Zusammenhang von Hemmung, Fluoridkonzentration und pH-Wert ein. BROWN et al. (1980) weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten bei verschiedenen Serotypen von *Streptococcus mutans* nach.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Bakterien und Kulturmedien

Der Bakterienstamm *Staphylococcus epidermidis* stammt aus Züchtungen von Herrn Dipl. Biochem. Netuschil, Universität Tübingen; bei dem kariogenen Bakterienstamm *Streptococcus mutans* handelt es sich um einen Keim des Serotyps d, der freundlicherweise von Herrn Professor Gehring, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt wurde.

Die Bakterienstämme wurden in Flüssigkeitskulturen gehalten, die alle 24 h im Verhältnis 1:10 in frische Medien überimpft und bei 37°C aerob inkubiert wurden.

Medium hierfür war ausschließlich Schaedler Broth der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, die nach Gebrauchsanweisung angesetzt und sterilisiert wurde.

Parallel zu den Flüssigkeitskulturen wurden Strichkulturen auf Schaedler Agar Platten (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgeführt, um Kontrollen auf Reinkulturen durchzuführen. *Streptococcus mutans* wurde zusätzlich auf Saccharoseplatten mit Säureindikator - Phenol Red Agar Base (Fa. Difco, Detroit, USA) plus 5 % Saccharose (Fa. Merck) - beimpft, um die charakteristische extrazelluläre Polysaccharidbildung zu kontrollieren (GEHRING 1981).

Alle geschilderten Messungen der Wachstumskurven wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Für die Parallelversuche mit unterschiedlichen Fluoridkonzentrationen wurden dem Schaedler Medium 1 mM bzw. 10 mM NaF (Fa. Merck) zugesetzt.

Wenn nicht in den Ergebnissen anders vermerkt, wurde zu Beginn jeder Wachstumskurve die Bakterienkultur in einem solchen Verhältnis überimpft, daß die für die Wachstumskurve zu messende Bakterienkultur zum Zeitpunkt t = 0 des Experiments eine optische Dichte von 0,1 E gegenüber reinem Schaedler

Medium bei einer Wellenlänge von 540 nm hatte, um Streuungen in der Vornormierung der Kulturen zu kompensieren und von definierten Bedingungen ausgehen zu können (vgl. 5.1.).

Für die einzelnen Messungen in den Wachstumskurven wurden in einem stündlichen Abstand unter sterilen Kautelen Proben entnommen und entsprechend 3.2., 3.3. und 3.4. untersucht.

3.2. Bestimmung der optischen Dichte

Um die Bakterienkulturen zu normieren und um während der Versuche einen schnell zu ermittelnden Vergleichswert für das Wachstum der Kultur verfügbar zu haben, wurde jeweils die Dichte der Bakterienkultur bestimmt. Dazu wurde die unter sterilen Kautelen entnommene Probe 1:10 in dem entsprechenden Medium verdünnt und gegen dieses Medium als Leerwert in einem Photometer (Fa. Bausch & Lomb) bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

3.3. Konventionelle Zellzahlbestimmungen

Zellzahlbestimmungen wurden mit Hilfe von Bakterienzählkammer und Plattierungsverfahren durchgeführt.

In einer Bakterienzählkammer (Fa. Neubauer) wurden jeweils diagonal vier und ein weiteres, sich in einer dritten Ecke befindendes Quadrat unter einem Mikroskop (Ortholux, Fa. Leitz) bei 390-facher Vergrößerung und Dunkelfeldbeleuchtung ausgezählt. Bei höheren Bakterienkonzentrationen wurde vor dem Zählen entsprechend verdünnt.

Aus den Zellzahlwerten der Bakterienzählkammer wurde ein größenordnungsmäßig sinnvoller Faktor für die Verdünnung der Bakterienkulturen für eine Plattierung bestimmt. Diese wurde auf Schaedler Agar Platten (Fa. Becton Dickinson, Heidel-

berg) durchgeführt, die nach 24-36 h anaerober Bebrütung bei 37°C ausgezählt wurden. Bei jeder Plattierung wurden zwei Platten direkt ohne Ultraschallbehandlung, zwei weitere mit Ultraschallbehandlung der Bakterienkultur mit dem Sonicator W-225 R (Fa. Heat Systems-Ultrasonics, USA) in der Stärkeintensität 3 und zwei Platten mit einer Ultraschallbehandlung in der Stärkeintensität 5 ausplattiert (vgl. 4.6.1.).

3.4. ATP-Messungen mit Hilfe der Biolumineszenz

Für die ATP-Messungen stand ein Biolumineszenzmeßgerät, der "Lumacounter 2080" (Fa. Lumac AG, Basel) zur Verfügung. Das Gerät wurde freundlicherweise von Herrn Professor Botzenhart, Leiter des Hygieneinstitutes der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Herrn Professor Botzenhart sei an dieser Stelle für sein Entgegenkommen herzlichst gedankt.

3.4.1. Reagentien der Biolumineszenzreaktion

Die für die Luziferin-Luziferase-Meßreaktion benötigten Reagenzien wurden als Bakterienreagenziensatz (Fa. Abimed, Düsseldorf) bezogen. Der Satz enthält:

- Lumit PM: ein vom Hersteller in liophylisierter Form vorliegendes Gemisch aus Luziferin und Luziferase, fertig abgepackt in Fläschchen, das zu jedem Versuch in 5 ml Hepes-Puffer (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure) gelöst wird.
- NRB: Nucleotid-Releasing-Reagens für Bakterien
- ATP: Fläschchen mit jeweils 10 µg ATP als Dinatriumsalz, welches in 10 ml dest. H_2O aufgelöst wurde, in Aliquoten von jeweils 0,5 ml bei -20°C eingefroren wurde und jedem Versuch zur Herstellung einer Standardvergleichslösung diente.

Während der Versuche wurde NRB bei Raumtemperatur und die ATP-Standardlösung im Eisbad aufbewahrt. Die Lumit PM Lösung wurde jeweils bei direktem Bedarf angesetzt und durch den Lumacounter auf 30°C temperiert.

3.4.2. Meßvorgang

Die vom Lumacounter gemessene, der ATP-Menge proportionale Lichtmenge wird vom Gerät in Relative Light Units (RLU) digital angezeigt. Die Bestimmung der ATP-Mengen aus den RLU erfolgte entweder über eine zuvor erstellte Eichkurve oder über interne Standardisierung. Zur eigentlichen Messung wurde das Gerät folgendermaßen eingestellt:

- Injection = automatic
- Mode = Integration
- Heating = on
- Time = 10 s

Die unter sterilen Kautelen entnommene Bakterienprobe mußte entsprechend dem Meßbereich des Lumacounters in reinem Schaedler Medium verdünnt werden (vgl. 4.4.). In die für den Counter vorgesehenen Polystyrolküvetten 12 x 47 mm (Fa. Abimed, Düsseldorf) wurde einpipettiert:

a. zur einfachen Messung:
   188 µl dest. H_2O
   94 µl entsprechend verdünnte Bakteriensuspension
   94 µl NRB

b. zur internen Standardisierung
   94 µl dest. H_2O
   94 µl ATP-Standard bekannter ATP-Konzentration
   94 µl verdünnte Bakteriensuspension entsprechend a.
   94 µl NRB

Dieses Gemisch wurde in der Polystyrolküvette auf einem Whirl-Mix (Fa. Wilten & Co. B.V. Inc., USA) für exakt 5 s bei niedrigst einstellbarer Intensität vermengt. Anschließend wurde die Küvette sofort in den Meßschacht des Lumacounters

gebracht, der Dispenserarm eingeschwenkt und durch Starten des Meßvorganges automatisch 94 ± 2 µl Lumit PM in die Meßküvette eingespritzt.

Drei Einzelmessungen wurden pro ATP-Meßwert durchgeführt, lagen diese Einzelmessungen in ihren Werten mehr als 5 % auseinander, wurden i.a. noch zwei weitere Einzelmessungen durchgeführt.

3.4.3. Berechnung der ATP-Menge aus den RLU

Mit Hilfe einer Eichkurve, die vorher mit bekannten ATP-Mengen erstellt worden ist, lassen sich direkt aus den RLU auf die ATP-Mengen schließen. Fig. 1 gibt eine solche Eichkurve wieder. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß inhibierende Faktoren des Bakterienmediums (vgl. 4.4.), optische Quencheffekte und Aktivitätstoleranzen sowie eventuell mangelhafte Temperierung des Lumits PM unberücksichtigt bleiben.

Bei dem Verfahren der internen Standardisierung werden diese Faktoren miterfaßt, da sie sich auf die zugesetzte bekannte ATP-Menge der zweiten Messung genauso auswirken. Somit kann aus der Differenz der RLUs beider Messungen - diese repräsentiert die zusätzliche, bekannte ATP-Menge der Standardlösung - auf die ATP-Menge der Probe umgerechnet werden:

$$ATP_p(ng) = \frac{\text{ATP-Std.(ng)} \times (RLU_p - RLU_{lw}) \times V \times 100}{(RLU_s - RLU_p) \times 94}$$

Es bedeuten dabei:

ATP_p(ng):	ATP-Size der Bakterienprobe in ng pro 100 µl
ATP-Std.(ng):	die Menge ATP, gemessen in ng, die sich in 94 µl Standardlösung befindet
RLU_p:	RLU der einfach gemessenen Bakterienprobe
RLU_{lw}:	RLU des Leerwertes der Messung, d.h. Rauschen des Photomultipliers, ATP-Kontaminationen der Reagentien und der Küvetten, usw.

V: Faktor der Verdünnung der Bakterien unmittelbar vor der Messung

RLU_s: RLU der zu messenden Bakterienprobe plus der zugegebenen Standardlösung

94 bzw. 100: Faktoren, um von 94 µl Meßvolumen auf 100 µl umzurechnen (vgl. 4.1.)

Der trotz Eisbad eintretende Aktivitätsverlust der Standardlösung wurde während einer längeren Versuchsdauer bei der Berechnung zusätzlich berücksichtigt.

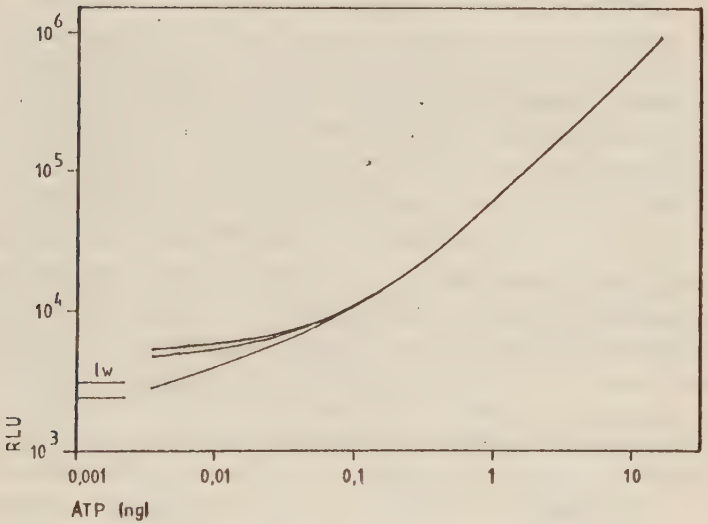


Fig. 1: Eichkurve
ATP-Messung unter Bedingungen der Bakterienmessung: Korrelation von RLU zu ATP-Menge

4. METHODISCHER TEIL DER DISKUSSION

In diesem Abschnitt sollen alle methodischen Aspekte der Technik der Biolumineszenzmessung diskutiert werden. Diese Meßmethode wird vom Hersteller als schnell, genau, sehr empfindlich und für den alltäglichen Laboratoriumsbetrieb geeignet dargestellt. In diesem Sinne gilt es, Meßgenauigkeit und Meßgrenzen zu bestimmen, die für den Anwendungszweck bzw. die eingangs dargestellte Fragestellung von Bedeutung sind.

4.1. Meßgenauigkeit und Fehlerabschätzung

Für die Abschätzung der Meßgenauigkeit im Lumacounter bedarf es folgender reaktionskinetischer Überlegungen: Damit die Biolumineszenzreaktion optisch überhaupt sinnvoll verfolgt werden kann, muß sie sich über einen längeren Zeitraum hinweg konstant abspielen. Von welchen Reaktionspartnern ist die Luziferin-Luziferase-Reaktion intensitätsmäßig abhängig?

Das Enzym Luziferase (E) hat in vitro praktisch keinen Umsatz, sondern reagiert stöchiometrisch zum "dead end complex" Enzym-Luziferin (E-L), dessen Dissoziationsrate vernachlässigbar klein ist (WULFF 1982). Unter Bedingungen eines ATP-Tests gehorcht also die Luziferase-"katalisierte" Reaktion dem Gesetz einer Reaktion 2. Ordnung. Es gilt:

$$\frac{dC_{(E-L)}}{dt} = v = \text{const.}\ C_E \times C_{ATP}$$

mit: v = Umsatzgeschwindigkeit ≙ Photonenausbeute
C = Konzentration

Die Lichtausbeute der Biolumineszenzreaktion pro Zeiteinheit ist dem Produkt aus ATP-Konzentration und Enzymkonzentration direkt proportional.

Die automatische Dispensereinrichtung des Lumacounters 2080, der in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand, spritzte keine konstante Enzymmenge in die Meßküvette. Statt der Herstellerangabe 100 µl ± 0,5 % wurden 94 µl ± 2 % Enzym in die Meßküvetten eingespritzt. Aufgrund der oben genannten Meßkinetik muß diese Abweichung von 2 % sich in allen Meßergebnissen niederschlagen.

Im Pumpensystem der Dispensereinrichtung befinden sich stets ca. 700 µl Lumit PM, mit denen die nächstfolgenden Messungen durchgeführt werden. Jeweils nach einer Meßpause, wie sie während der Messung in einer Wachstumskurve häufig auftritt, zeigen die ersten Meßwerte relativ zu wenig RLU. Es ist denkbar, daß das Lumit in der Dispensereinrichtung durch Interaktionen mit den verwendeten Materialien einen Aktivitätsverlust erleidet. Aus diesem Grund empfiehlt die Fa. Boehringer in ihren Anleitungen, ihre Meßreagenzien ausnahmslos manuell einzupipettieren. Infolge manueller Ungenauigkeiten beim Starten der Reaktion durch Einpipettieren des Lumits in die Meßküvette ist bei diesem Verfahren die Durchmischung der Reagenzien von Messung zu Messung nicht gleichmäßig, was die Meßgenauigkeit negativ beeinflußt.

Eine weitere Konsequenz aus der Reaktionskinetik ist die unbedingte Anwendung der Eichung mit Hilfe der internen Standardisierung, da chargenbedingte Aktivitätsdifferenzen des Lumits PM nicht auszuschließen sind.

Da diese und weitere, noch darzulegende Faktoren die Meßgenauigkeit für den ATP-Pool in Wachstumskurven einschränken, erscheint in diesem Abschnitt lediglich die Angabe der Standardabweichung in Messungen von Eichkurven mit synthetischem ATP bei Meßwerten über 10 000 RLU von 3 % sinnvoll.

Anmerkung: Obige Reaktionskinetik der Biolumineszenzreaktion macht es verständlich, daß die Eichkurve ATP-RLU nach einer werksseitigen Wartung des Lumacounters mit Neueinstellung des Dispenservolumens sich in ihrer Steilheit verändert und neu bestimmt werden muß.

4.2. Minimaler Grenzwert der Messung

Der Nachweis von ATP mit Hilfe der Biolumineszenz ist eine sehr empfindliche Methode, deren untere Meßgrenze jedoch durch die ubiquitäre Anwesenheit von ATP erheblich eingeschränkt wird.

Bei Messungen des Leerwertes der Reagenzien und des reinen Mediums ohne Bakterien stellte sich ein Leerwert von durchschnittlich 2150 RLU ein. Davon entfielen ca. 220 RLU auf das Rauschen des Photomultipliers, ca. 650 RLU auf das NRB und noch einmal 650 RLU auf das Kulturmedium. Weitere Quellen für den Leerwert sind in ATP-Kontaminationen im dest. Wasser und den Meßküvetten zu suchen.

Schon in dem käuflichen, sterilen Wasser für Injektionslösungen sind ATP-Konzentrationen von 10^{-9} - 10^{-11} mol/l nachzuweisen (WULFF 1982). Dies entspricht ca. 0,6 - 60 pg ATP pro 100 µl.

Um diese Werte im Zusammenhang der Problematik dieser Arbeit etwas zu illustrieren, sei angemerkt, daß ein Leerwert von etwas über 2000 RLU bei einem durchschnittlichen ATP-Pool von ca. 1 fg pro Bakterium immerhin dem ATP-Gehalt von 30 000 Bakterien entspricht.

Wie aus der Eichkurve (Fig. 1), die unter den in 3.4.2. genannten Bedingungen erstellt wurde, zu sehen ist, fängt schon bei Werten kleiner als 10 000 RLU ein Streubereich an, der sich durch eine Aufspaltung der Kurve manifestiert. Das hier feststellbare Abweichen vom linearen Verlauf der Eichkurve ist durch die bei geringer werdenden ATP-Mengen in der Meßprobe immer stärker hervortretenden ATP-Kontaminationen der Meßprobe bedingt. Zum Vergleich sind die reinen ATP-Kontaminationen als RLU-Leerwerte (lw) links in Fig. 1 angegeben.

Der vom Hersteller in der Betriebsanleitung des Lumacounters 2080 angegebene Grenzwert von 0,1 pg ATP entsprechend 100 Bakterien erscheint deshalb nicht erreichbar.

Die Angabe unterer Grenzwerte der geschilderten Methode schwanken in der Literatur erheblich (Tab. 1).

Tabelle 1: Minimaler Grenzwert der Biolumineszenzmessung
a = auf theoret. Einsatzvolumen Lumacounter
- = Umrechnung wegen fehlender Angabe des Meßvolumens nicht möglich
+ = Messung mit reinen synthetischen ATP-Lösungen

Autor	Grenzwert	Umrechnung[a]
D'EUSTACHIO und LEVIN (1967)	10^{-7} µg	-
CONN et al. (1975)	10 ng/ml^{+} 100 000 Bakt./ml	1 ng/100 µl
DISTLER et al. (1980)	40 x 10^{-15} mol^{+} 2 pg/50 µl	- 4 pg/100 µl
KEMP (1979)	10^{-14} mol^{+}	-
PICCIOLO et al. (1978)	10^{-6} µg^{+}, 10 000 Bakt./Messung	-
BOEHRINGER (1981)	10^{-12} mol/l^{+}	0,06 pg/100 µl
LUMAC	0,1 pg/Messung 100 Bakt./Messung	0,1 pg/100 µl

Bei allen Grenzwertangaben ist darauf zu achten, ob zu deren Bestimmung reine ATP-Lösungen oder Bakterien benutzt worden sind, da bei der Bestimmung der Bakterienzahl einer Probe sowohl das Testmedium als auch die Behandlung zur Extraktion des Bakterien-ATPs die Meßgrenze entscheidend beeinflussen.

Die Firma Boehringer beschreibt in ihren Informationsschriften Methoden zur Senkung des Leerwertes. U.a. wird eine Senkung dadurch erreicht, daß alle Reagenzien und verwendeten Geräte mit ATPase vorbehandelt werden, soweit dies möglich ist. Das Reagenziengemisch wird über Nacht dunkel aufbewahrt, Rest-ATP verbraucht sich während dieser Zeit in der Biolumi-

neszenzreaktion. Die eigentliche Messung wird dann im Gegensatz zur dargestellten Methode durch Zugabe der zu messenden ATP-haltigen Probe gestartet. Dies bedeutet jedoch einen enormen Mehraufwand, der bei der kontinuierlichen Verfolgung des ATP-Verlaufs in Wachstumskurven schlecht durchführbar ist.

Um dem Problem der Messung im unteren Grenzwertbereich aus dem Wege zu gehen, kann die Bakterienprobe durch Zentrifugieren oder Filtrieren vor der Messung konzentriert werden (JANTZEN 1974, CHAPPELLE et al. 1978). Dadurch ist jedoch nicht mehr gewährleistet, daß der ATP-Pool während dieser Manipulationen konstant bleibt. COLE et al. (1967) zeigen beispielsweise, daß bei Trennung der Bakterien von ihrem Medium vor der Messung ihr ATP-Pool sinkt.

Für die vorliegenden Versuche dieser Arbeit ist das Problem des unteren Grenzwertes allerdings nicht akut, da mit wesentlich größeren Bakterienmengen gearbeitet wurde.

4.3. Extraktionsmethode

Wie in der Schrifttumsübersicht dargestellt wurde, sind verschiedene Methoden beschrieben worden, um das intrazelluläre ATP für die Biolumineszenzreaktion zugänglich zu machen.

In den vorliegenden Versuchen wurde das von der Fa. Lumac angegebene Nucleotid Releasing Reagens für Bakterien (NRB) verwendet. Laut LUMAC APPLICATIONS (1979) wird die Bakterienmembran durch NRB für kleine Moleküle - auch ATP - durchlässig gemacht, ATP diffundiert entlang dem Konzentrationsgefälle aus der Zelle heraus. Weitere Angaben werden von der Firma zu Zusammensetzung und Wirkungsweise nicht gemacht.

Es bleibt unklar, ob und wie schnell die Lebensvorgänge in der Bakterienzelle selbst abgetötet werden, insbesondere ob ATP-synthetisierende Stoffwechselleistungen nach Perforation der Membranen und Herausdiffusion des ATPs aus der Zelle noch

aktiv sind, um dem rapiden ATP-Konzentrationsabfall in der Zelle entgegenzuwirken. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt des Gesamtumsatzes des in der Zelle befindlichen ATPs von entscheidender Bedeutung (Vgl. 6.4.4.).

Aus diesem Grund sind auch die Angaben über den Zeitraum, der zwischen dem Beginn der Extraktionsmethode bzw. der Entnahme der Probe und der Messung im Photomultiplier höchstens verstreichen darf, ohne das Meßergebnis zu beeinflussen, in der Literatur uneinheitlich. HARRISON und MAITRA (1969) geben für diesen Zeitraum in ihren Messungen 0,2 s an, COLE et al. (1967) fordern möglichst kurze Zeitspannen, HOLMS et al. (1971) beschreiben, daß ein Zeitraum von bis zu 30 s zwischen Beginn der ATP-Extraktion und der eigentlichen Messung keinen Einfluß auf das Meßergebnis hat.

In der vorliegenden Arbeit lagen zwischen Entnahme der Probe und der ersten Messung ca. 30 - 40 s, ein Einfluß dieser Zeitspanne kann nicht ausgeschlossen werden. Eine wesentliche Verkürzung war wegen der vorgegebenen experimentellen Möglichkeiten nicht durchzuführen.

4.4. Inhibitoren der Biolumineszenzreaktion

Schon SELIGER (1973) weist auf eine starke Beeinflussung der Biolumineszenzreaktion durch Metallionen hin, er gibt sogar aufgrund dieser Abhängigkeit Meßverfahren mit Hilfe der Biolumineszenz für Calciumionen und andere Spurenelemente (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni; Br_2, J_2) an. Die dabei erreichte Empfindlichkeit liegt bei 10^{-8} - 10^{-11} M. Da sehr leicht dergleiche Elemente in diesen Konzentrationen in den Kulturmedien der Bakterien vorhanden sein können, ist eine Beeinflussung der Biolumineszenzreaktion durch sie nicht auszuschließen.

CONN et al. (1975) versuchen, durch Messung des ATP-Gehaltes von Urin eine Anwendung der Biolumineszenz zur Feststellung

einer Bakteriurie zu erschließen. Dabei stellt er in einem Vorversuch an synthetischem ATP fest, daß die Urine verschiedener Patienten Inhibitoren der Biolumineszenzreaktion enthalten, die die Meßreaktion unterschiedlichst hemmen. Er beschreibt Ergebnisse zwischen 4 und 99 % des Erwartungswertes bei Standardmessungen, dabei ist das Ausmaß der Inhibition nicht nur durch die verschiedenen Urine bedingt, sondern auch von der ATP-Menge abhängig.

Eigene Ergebnisse ergaben, daß die bakteriellen Stoffwechselprodukte einer steril filtrierten 18 h alten Kultur ab einer bestimmten Konzentration die Ausbeute der Biolumineszenzreaktion auf ein Zweihundertstel senkten. Hieraus ist die Notwendigkeit einer Verdünnung der Bakterienprobe vor der ATP-Messung zu folgern, um die inhibierenden Faktoren in ihrer Konzentration unter die Hemmschwelle der Biolumineszenzreaktion zu drücken (LEE et al. 1971, LUNDIN und THORE 1975).

4.5. Nichtbakterielles ATP

Während der Messung einer Wachstumskurve nimmt der extrazelluläre ATP-Gehalt des Bakterienmediums kontinuierlich zu, wie eigene Messungen ergaben. Dieser Background beeinflußt natürlich das Meßergebnis, die Abweichungen lagen in den vorliegenden Versuchen jedoch bei nur ca. 3 % und wurden deshalb nicht entsprechend korrigiert.

Über die ubiquitäre Anwesenheit des ATPs gilt zudem das im Abschnitt 4.2. erwähnte. Geht man über das Messen von Bakterienreinkulturen hinaus zur Messung von Proben nicht definierter Biotope, z.B. der Plaque, so kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine eukaryontische Zelle wie beispielsweise ein Leukozyt mit seinem 1000-fach höheren ATP-Pool das Meßergebnis stark verfälscht.

Vorbehandlungen mit Triton X-100 (Mischung aus Polyoxyethylen-

Äthern und anderen oberflächenaktiven Substanzen) (CHAPPELLE et al. 1978) hydrolysieren zwar dieses nichtbakterielle ATP, hemmen aber auch das Bakterienwachstum und lysieren Streptokokken, sind also für zahnmedizinisch-mikrobiologische Untersuchungen nicht geeignet (CONN et al. 1975, ROBRISH et al. 1979).

4.6. Referenzverfahren zur Ermittlung der Lebendzellzahlen einer bakterienhaltigen Probe

Zum Schluß dieser methodischen Diskussion soll auf die verwendeten Referenzverfahren zur Lebendzellzahlbestimmung eingegangen werden, ihre Problematik löst ja erst die Suche nach neuen Methoden zur Lebendzellzahlbestimmung aus. Zur Bestimmung des ATP-Pools eines Bakteriums muß neben dem ATP-Size auch die Lebendzellzahl der Probe konventionell ermittelt werden, daher kann sich die Biolumineszenz prinzipiell nie vollständig von diesen Referenzverfahren lösen.

Über die Schwierigkeiten der konventionellen Techniken zur Lebendzellzahlbestimmung insbesondere in Biotopen wie Plaque berichten ROBRISH et al. (1978) und KEMP (1979). Auf die Problematik der Lebendzellzahlbestimmung in Reinkulturen während Wachstumskurven mittels Plattierungsverfahren und Zählkammer sei im folgenden kurz eingegangen.

4.6.1. Plattierungsverfahren

Streptococcus mutans bildet beim Wachstum in Flüssigkeitskulturen lange Ketten von oft über 30 Einzelbakterien, die speziell in saccharosehaltigen Medien noch durch die extrazellulären Polysaccharide miteinander verkleben können. So kann man bei der Auszählung einer Agarplatte nach Inkubation nicht mehr entscheiden, ob eine Bakterienkolonie aus einem Einzel-

bakterium oder aus einem Konglomerat an Bakterien entstanden ist. Deshalb ist die Rückrechnung auf die vor der Inkubation aufgebrachten Bakterien nicht ohne weiteres möglich. Man spricht in diesem Fall nur noch von koloniebildenden Einheiten, sogenannten Colony-Forming-Units (CFU). Zudem muß angenommen werden, daß auch unter optimalen Wachstumsbedingungen nicht alle zur Zählung ausplattierten Bakterien auf der Platte anwachsen.

Aus diesen Gründen geben viele Autoren den ATP-Pool in CFU an (FREESE et al. 1969) oder wählen andere Bezugssysteme (FORREST 1965, HARRISON und MAITRA 1969, MAURER 1981, RIEDL 1981).

Um möglichst viele Einzelbakterien aus den Ketten zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit die auf die Platten zu bringenden Bakterienproben mit Ultraschall behandelt (vgl. 3.3.).

Vorversuche zeigten jedoch die Problematik dieses Vorgehens: Erhöht man die notwendige Stärke der Ultraschallbehandlung derart, daß unter mikroskopischer Kontrolle alle Bakterienketten in Einzelbakterien zerlegt werden, so sind die Bakterien einem derartigen Streß ausgesetzt, daß viele entweder abgetötet werden oder zumindest nicht mehr auf der Agarplatte anwachsen. Dieser Streß läßt sich bei geringerer Intensität der Ultrabeschallung unter eine "letale" Dosis verringern, jedoch liegen dann doch noch kürzere Bakterienketten vor, das Auszählen der Agarplatte ergibt wiederum nur CFU und nicht die Gesamtzahl der Bakterien.

Also kann die vorausgehende Ultraschallbehandlung zwar in ihrer Intensität optimiert werden, jedoch zeigten die Vorversuche als weitere Schwierigkeit, daß diese optimale Intensität sich mit dem Alter der Bakterienkultur ändert. Somit bedürfen die Werte für die Lebendzellzahl, die im Plattierungsverfahren ermittelt werden, einer kritischen Interpretation. Hier ist davon auszugehen, daß zu niedrige Werte erhalten werden.

4.6.2. Bakterienzählkammer

Die Bakterienzählkammer wird als Hilfsmittel zur Lebendzellzahlbestimmung von HOLM-HANSEN (1969), PICCIOLO et al. (1978) und KEMP (1979) angegeben. Durch die mikroskopische Betrachtung ist jedoch nicht ohne weiteres zu entscheiden, ob lebende oder tote Bakterien vorliegen. Der Wert, der mit Hilfe der Zählkammer für die Lebendzellzahl ermittelt wird, dürfte also höher als die wahre Lebendzellzahl liegen, da nicht auszuschließen ist, daß tote Bakterien mitgezählt werden. In den vorliegenden Versuchen wird jedoch die Bakterienzellzahl in Wachstumskurven unter für das Bakterienwachstum optimalen Bedingungen ermittelt, so daß die Anzahl der toten Bakterien als vernachlässigbar gering angenommen werden kann. Da in der stationären Phase die Menge der toten Bakterien zunimmt, werden die in dieser Phase ermittelten Werte im Vergleich zu den entsprechenden Werten der exponentiellen Wachstumsphase ungenauer.

4.6.3. Vitalfärbungen

Es besteht die Möglichkeit, durch spezielle Färbungen, z.B. mit Akridinorange (MAURER 1981), lebende und tote Bakterien verschieden anzufärben. Jedoch sind auch diese Methoden mit Ungenauigkeiten behaftet (BUCHERER 1943, MAURER 1981), so daß diese Verfahren für die vorliegenden Messungen keine weitere Verbesserung der Genauigkeit in der Lebendzellzahlbestimmung erbrachten. Neueste experimentelle Ergebnisse lassen auf eine unproblematischere Fluoreszenzfärbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) (NETUSCHIL und SCHMALZ 1981) hoffen.

4.7. Zusammenfassung

Schon aus dieser methodischen Diskussion läßt sich ableiten, daß systematische Fehler aufgrund der Meßproblematik nicht auszuschließen sind, daß die praktische Anwendung der Biolumineszenz zur Messung des bakteriellen ATP-Gehaltes nicht die Empfindlichkeit erreichen kann, die von den theoretischen Werten reiner ATP-Messungen erwartet werden kann, und daß absolute Angaben der ATP-Pools einzelner Bakterienstämme schon aufgrund der Meßmethodik und der Referenzmethoden einen Toleranzbereich aufweisen.

Diese Einschränkungen sollten stets bei der Anwendung der Biolumineszenz zur ATP-Bestimmung bedacht und in ihrer Interpretation - auch der Ergebnisse der folgenden Kapitel - berücksichtigt werden. Vergleichende Messungen, in denen sich durch paralleles Messen identischer Kulturen Fehler aufheben und durch die das Problem der Lebendzellzahlbestimmung umgangen werden kann (vgl. 7.), sind sicherlich einfacher zu interpretieren.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER ATP-MESSUNGEN BEI BAKTERIELLEN WACHSTUMSZYKLEN

5.1. Wachstumskurven von *Staphylococcus epidermidis*

Fig. 2 bis Fig. 4 zeigen die verschiedenen Wachstumskurven der Versuche 1N, 2N und 3N, in denen Flüssigkeitskulturen von *Staphylococcus epidermidis* als Vertreter der nichtkariogenen, nichtpathogenen Bakterien Verwendung finden. Um eine Reproduzierbarkeit und damit eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander zu erzielen, wurde bei der Gewinnung der Bakterienkulturen für die experimentellen Messungen der Wachstumskurven ein in Tab. 2 dargestelltes Normierungsschema angewandt:

Tabelle 2: Normierungsschema der Vorkulturen für die Versuche 1N, 2N, 3N und $3F_{10}$

	Versuch			
	1N	2N	3N	$3F_{10}$
laufende Flüssigkultur	1:3	1:3	1:3	
Vorkultur a	10h	10h	10h	
	1:10	1:10	1:10	
Vorkultur b	12h	12h	12h	
optische Dichte (E)	1,3	1,5	1,9	
Verdünnungsfaktor	1:13	1:15	1:19	1:19
Versuchskultur				
Anfangsdichte (E) für t=0	0,1	0,1	0,1	0,1

Anmerkung: Parallel zu Versuch 3N lief eine identische, zu Versuchsbeginn aus Vorkultur b entnommene Kultur, der für Versuch $3F_{10}$ 10 mM NaF zugesetzt worden war (vgl. 5.5.).

Aus den laufenden Flüssigkeitskulturen wurde eine Vorkultur a 1:3 in Schaedler Medium verdünnt, 10 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, 1:10 als Vorkultur b in gleichem Medium verdünnt und weitere 12 h unter denselben Bedingungen inkubiert. Die optische Dichte dieser Vorkultur b wurde gemessen und dann so für die eigentlich zu untersuchende Wachstumskultur mit Schaedler Medium verdünnt, daß diese bei Beginn des Versuches eine optische Dichte von 0,1 E bei 540 nm gegen reines Schaedler Medium aufwies. Dadurch wurden zu Beginn der Messung jeder Wachstumskurve annähernd gleiche Zellzahlen in der zu untersuchenden Kultur erreicht, soweit dies die Meßgenauigkeit der optischen Dichte zuläßt.

Bezüglich des letzten, variablen Verdünnungsschrittes von der Vorkultur b zu der zu untersuchenden Versuchskultur unterscheiden sich die Versuche 1N, 2N und 3N, wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist: In Versuch 3N ist die Vorkultur b während ihrer 12-stündigen Inkubation wesentlich dichter gewachsen (optische Dichte zum Zeitpunkt des Überimpfens 1,9 E) als in der gleichen Zeit die Vorkultur b des Versuches 1N (optische Dichte zum Zeitpunkt des Überimpfens 1,3 E). Das Verhalten der Vorkultur b des Versuches 2N nimmt in dieser Beziehung eine Mittelstellung ein.

Der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und den dazugehörigen Zellzahlen, die als Gesamtheit wieder eine Wachstumskurve mit ihren einzelnen Wachstumsphasen widerspiegeln, zeigt Fig. 5. In ihr ist eine Wachstumskurve mit Zellzahlen und der dazugehörigen optischen Dichte dargestellt, deren Werte in einem Vorversuch ermittelt wurden. Sie soll an dieser Stelle exemplarisch zur theoretischen Erörterung der Bedeutung der optischen Dichte der Vorkulturen b zum Zeitpunkt des Überimpfens dienen. Aus diesem Grund können Zellzahlen und Zeit nur ohne Größenangaben dargestellt werden und deshalb sind die Entnahmepunkte aus der Vorkultur b für das Überimpfen in den einzelnen Versuchen markiert.

Fig. 2 und 3: Wachstumskurven und ATP-Gehalt von *Staphylococcus epidermidis*

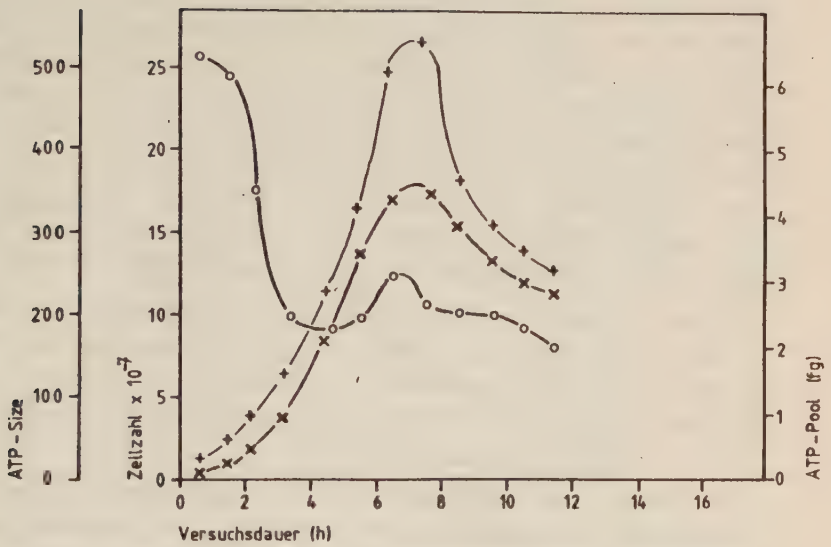


Fig. 2 Versuch 1N

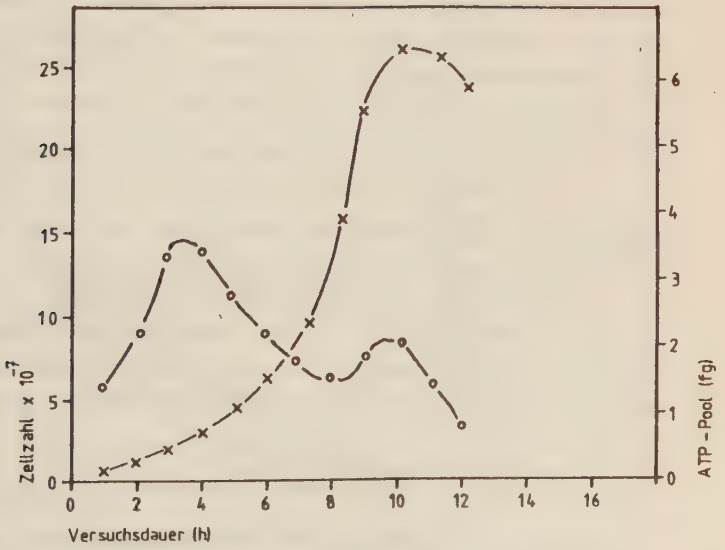


Fig. 3 Versuch 2N

× Zellzahl
+ ATP - Size
o ATP - Pool

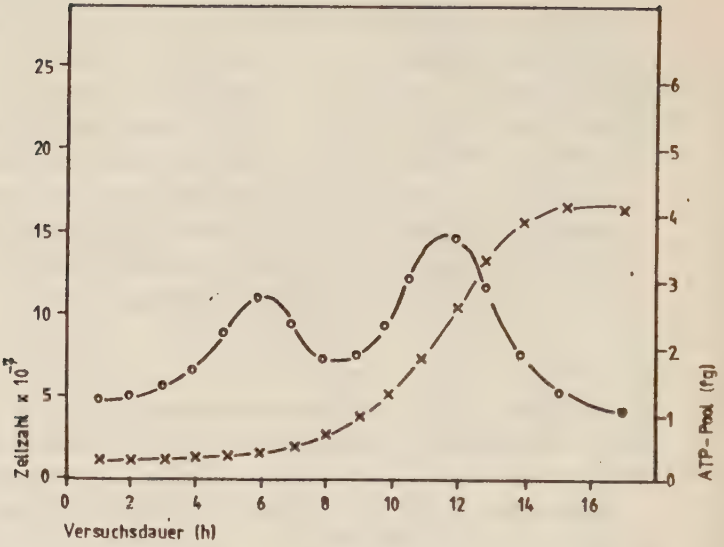


Fig. 4 Versuch 3N

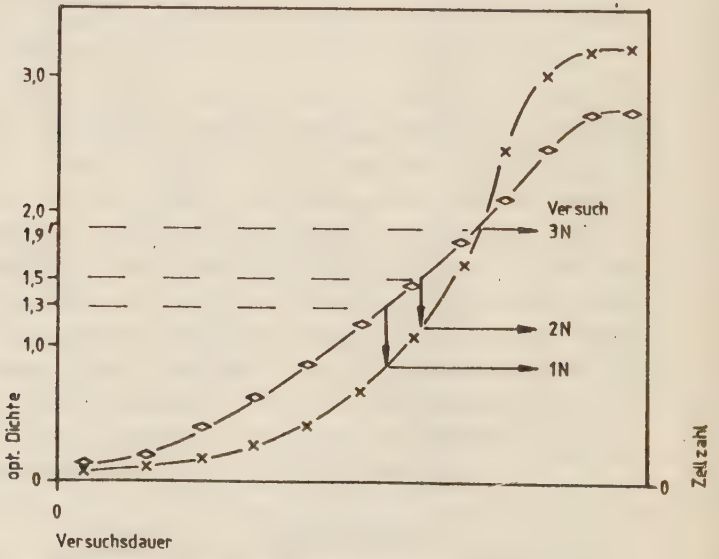


Fig. 5 Relation Dichte - Zellzahl der Vorkulturen b

× Zellzahl
○ ATP-Pool
◇ opt. Dichte

Es zeigt sich aus Fig. 5, daß die Vorkultur b im Versuch 3N, ersichtlich aus ihrer optisch höheren Dichte, zum Zeitpunkt des Überimpfens weiter in ihrem exponentiellen Wachstum in Richtung stationärer Phase fortgeschritten ist als die Vorkultur b des Versuchs 1N zum gleichen Zeitpunkt. Somit sind im Versuch 3N die Bakterien beim Überimpfen aus der Vorkultur b in die Versuchskultur in ihrer Stoffwechselregulation infolge ihres schnelleren Wachstums in der Vorkultur b schon mehr auf die stationäre Phase eingestellt, die bei über die 12-stündige Inkubation hinausgehender Bebrütung folgen würde.

Nach dem Überimpfen in die Versuchskultur muß sich nun die Stoffwechselregulation in dem neuen Medium in Versuch 3N erst auf erneute Zellteilung einstellen. So ist die lange lag-Phase der Bakterien in der Wachstumskurve im Versuch 3N zu erklären.

Ein anderes Verhalten zeigen die Bakterien des Versuchs 1N. Ihre Vorkultur b ist während der zwölfstündigen Inkubation relativ langsam gewachsen, zum Zeitpunkt des Überimpfens befanden sich die Bakterien der Vorkultur b im Beginn ihres exponentiellen Wachstums. Ihre Stoffwechsellage war voll auf Zellteilung eingerichtet, weshalb es nicht verwundert, daß die Bakterien in Versuch 1N ihre Teilungsaktivität relativ schnell ohne größere vorhergehende lag-Phase fortsetzen.

Alle diese Betrachtungen treffen auch auf Versuch 2N zu, der in seinem Verhalten eine Mittelstellung einnimmt.

Aus Fig.5 ergibt sich zudem, daß optische Dichte und Zellzahl einer Kultur nicht exakt proportional sind. Dies resultiert einmal aus der Flüssigkeitsaufnahme der Bakterien und der anschließenden Desaggregation (RIEDL 1981) als auch in einem absorptionsmäßig gesehen unterschiedlichen Verhalten von Bakterienketten gegenüber der gleichen Anzahl an Einzelbakterien.

Fig. 4: Wachstumskurven und ATP-Gehalt von *Staphylococcus epidermidis*

Fig. 5: Relation OD zu Zellzahl bei *Staphylococcus epidermidis* und Entnahmepunkte für Versuche 1N, 2N und 3N.

Die Normierung der Vorkulturen der einzelnen Versuche muß als nur teilweise erreicht angesehen werden, da sich die Vorkulturen b der einzelnen Versuche in ihrer optischen Dichte nach 12-stündiger Bebrütung unterscheiden. Somit ist auch der Verlauf der Wachstumskurven in den Versuchen 1N, 2N und 3N unterschiedlich. Für den Wert der Aussagekraft der Versuche ist dies jedoch nicht einschränkend, im Gegenteil, es zeigt sich, daß dadurch eine Verschiedenheit in den zu erörternden Kurven erreicht wird, die für das Ergebnis dieser Arbeit bedeutsam ist.

5.2. Ergebnisse und Vergleich der ATP-Messungen mit Wachstumskurven von *Staphylococcus epidermidis*

Die Messungen der Wachstumskurven der Versuche 1N, 2N und 3N erfolgten in reinem Schaedler Medium. Aus dem zu den unterschiedlichen Vorkulturen Gesagtem ist verständlich, daß das Ende der Wachstumskurven der Versuche unterschiedlich schnell erreicht wird, weil die zum Beginn der Versuche dichtemäßig identischen Bakterieneinwaagen sich in unterschiedlichen Stoffwechselzuständen befinden. Dementsprechend ist in Versuch 1N das Ende der exponentiellen Wachstumsphase bereits nach 7 h, in Versuch 2N nach 10 h und Versuch 3N erst nach 15 h erreicht.

Gleiche Beobachtungen machen HARRISON und MAITRA (1969), die ausführen: "... die Vorgeschichte einer Bakterienkultur hat Einflüsse auf deren augenblickliche Einstellung ihres Enzymsystems". RIEDL (1981) weist gleichermaßen auf die Abhängigkeit einer Wachstumskurve von ihrer Vorgeschichte hin.

Der ATP-Pool liegt in Versuch 1N bereits zu Beginn sehr hoch, in Versuch 2N erreicht er relativ schnell mittlere Werte, während er in Versuch 3N für 4 h verhältnismäßig niedrig bleibt. HESS (1963) und FORREST (1965) diskutieren einen Mindest-ATP-Pool, der vorhanden sein muß, damit exponentielles Wachstum überhaupt möglich sei, darunter wäre nur lineares

Wachstum zu finden. Diese Aussage muß anhand der vorliegenden Kurven eingeschränkt werden, nimmt doch der ATP-Pool während der exponentiellen Wachstumskurve stark ab, ohne daß das Wachstum in ein lineares übergeht. Sowohl bei Betrachtungen des ATP-Pools als auch des Wachstums sollten die äußeren Bedingungen wie der Zustand des Nährmediums nicht unberücksichtigt gelassen werden.

Der ATP-Pool schwankt in den einzelnen Versuchen während der Wachstumskurve erheblich, so daß kein feststehender Wert für den ATP-Pool von *Staphylococcus epidermidis* angegeben werden kann. Auch gibt es Unterschiede im Verlauf des ATP-Spiegels zwischen den einzelnen Versuchen, die eine absolute Angabe nicht zulassen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann lediglich ein ungefährer Mittelwert für den ATP-Pool von *Staphylococcus epidermidis* bei 2 fg ATP pro Mikroorganismus während einer Wachstumskurve unter optimalen Bedingungen für die Zellteilung der Bakterien in Schaedler Medium angesetzt werden. HÖJER et al. (1976) geben für *Staphylococcus epidermidis* in einer Wachstumskurve 3,15 - 5,25 fg ATP pro CFU an; in den LUMAC APPLICATIONS wird der ATP-Pool für *Staphylococcus epidermidis* bei 0,22 fg ATP pro Bakterium angegeben.

Charakteristisch für alle drei vorliegenden Versuche ist, daß der ATP-Pool zu Beginn der exponentiellen Wachstumskurve ein relatives Maximum durchläuft, dem sich ein Abfall im Laufe des exponentiellen Wachstums anschließt. Dieser Abfall darf jedoch nicht als Ausnützung einer Pufferkapazität des ATP-Pools angesehen werden. Es sei der theoretischen Diskussion an dieser Stelle soviel zum Verständnis der ATP-Pool Kurven vorweggenommen, daß der "Vorrat" des ATP-Pools infolge seiner im Sekundenbereich liegenden Turnovertime (vgl. HARRISON und MAITRA 1969) viel zu gering wäre, um überhaupt den steigenden Bedarf einer Zelle in der exponentiellen Wachstumsphase zu decken. Wie später noch detailliert dargestellt wird, zeigt sich in dieser Phase, daß während der maximalen Syntheseleistung der einzelnen Bakterienzellen der

gestiegene ATP-Bedarf durch eine Verkürzung der Turnovertime des ATP-Pools bereitgestellt wird.

Logisch ist, daß die ATP-Pool Kurve in der stationären Phase der Versuche nicht zu ihrem Ausgangswert am Anfang des Versuchs zum Zeitpunkt t = 0 zurückkehrt. Dies ist u.a. dadurch zu erklären, daß

- dieser Ausgangswert erst noch wesentlich später im Verlauf der nicht mehr gemessenen Wachstumskurve erreicht werden würde
- die Medienbedingungen verschieden sind: zu Beginn der Wachstumskurve liegen Bakterien der stationären Phase der Vorkultur b in unverbrauchtem Schaedler Medium verdünnt vor, zum Ende der Versuche ist das die Bakterien umgebende Medium verbraucht, es haben sich Zelltoxine angehäuft, die durch die Bakterien verwertbaren Substrate sind verbraucht
- je später in der stationären Phase man den ATP-Size mißt, desto geringer wird die Genauigkeit der Einzelmessungen (vgl. 4.6.2.; 7.).

5.3. Vergleich der Wachstumskurven von *Streptococcus mutans*

Die entsprechenden Versuche 4N und 5N sind in den Fig. 6 und Fig. 7 dargestellt.

Bei *Streptococcus mutans* gelten die Aussagen bezüglich der Vornormierungen der Wachstumskulturen prinzipiell genauso wie für *Staphylococcus epidermidis*. Es wurde aber bei den Versuchen 4N und 5N bewußt auf eine einheitliche Vornormierung verzichtet, damit der Einfluß der Vorgeschichte einer Wachstumskultur auf deren Wachstumsverhalten und insbesondere auf deren Verlauf in der ATP-Pool Kurve dargestellt werden konnte.

Die einzelnen Verdünnungsschritte sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Normierungsschema der Vorkulturen für die Versuche 4N und 5N

	Versuch 4N	Versuch 5N
laufende Flüssigkultur	1:3	1:3
	↓	↓
Vorkultur a	10 h	10 h
	↓ 1:10	↓ 1:20
Vorkultur b	12 h	16 h
	↓	↓
optische Dichte (E)	0,24	2,4
Verdünnungsfaktor	1:4	1:24
	↓	↓
Versuchskultur		
Anfangsdichte (E) für t = 0	0,06	0,1

Der Vergleich im Wachstumsverhalten beider Versuche zeigt, daß Versuch 4N in seiner Wachstumskurve nach 7 h 20 min das Maximum erreicht hat, obwohl seine Bakteriendichte nur 60 % der Dichte von Versuch 5N zu Beginn des Versuchs im Zeitpunkt t = 0 entsprach. In Versuch 5N wurde das Maximum in der Wachstumskurve erst nach 8 h 20 min erreicht, obwohl hier die Bakterieneinwaage anzahlmäßig größer war. Dieses Verhalten bestätigt voll das in 5.1. Gesagte.

Auch bezüglich des Verlaufes der ATP-Pool Kurve unterscheiden sich beide Versuche, sinngemäß gilt auch hier das bei *Staphylococcus epidermidis* Erörterte.

Ein Mittelwert für den ATP-Pool bei *Streptococcus mutans* läßt sich aus den Messungen unter den erwähnten Vorbehalten mit 0,3 - 0,6 fg ATP pro Bakterium angeben.

Durchschnittlich liegt also der ATP-Pool von *Streptococcus mutans* im Vergleich zu *Staphylococcus epidermidis* um fast ei-

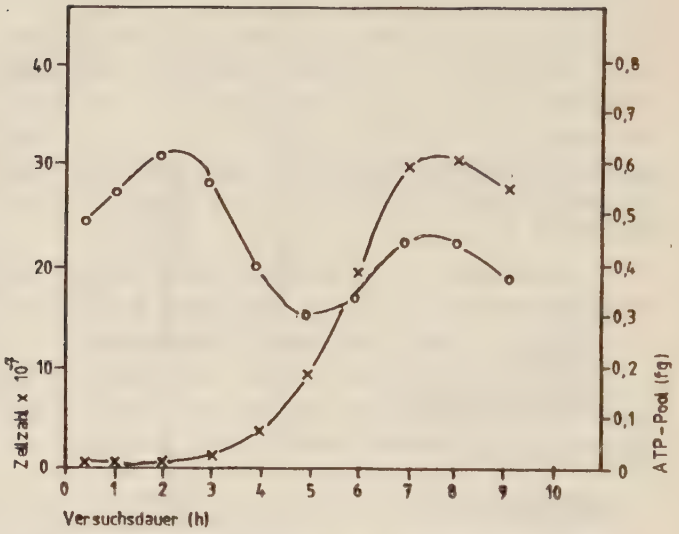


Fig. 6 Versuch 4N

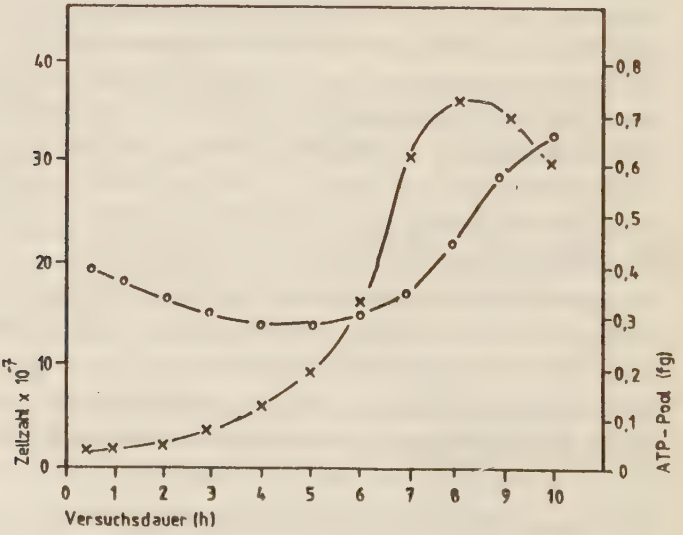


Fig. 7 Versuch 5N

× Zellzahl
o ATP-Pool

ne Zehnerpotenz niedriger. Dieser Unterschied ist nicht in einer Volumendifferenz zu erklären - *Streptococcus mutans* müßte ja dann aufgrund geometrischer Abschätzung nur halb so groß wie *Staphylococcus epidermidis* im Durchmesser sein. Beide Bakterienarten sind aber in ihrer Größe nahezu identisch (WIESMANN 1978). ATP muß also bei *Staphylococcus epidermidis* in entsprechend höherer Konzentration vorliegen.

Zusammenfassend läßt sich aus den Versuchen 1N - 5N folgendes sagen:

- der gemessene ATP-Pool ist während des Durchlaufens einer Wachstumskurve nicht konstant;
- die Wachstumskurven als auch die ATP-Pool Kurven sind in ihrem Verlauf von dem Zustand der Bakterien bei Start des Versuches abhängig und somit in verschiedenen Versuchen unterschiedlich;
- *Staphylococcus epidermidis* weist einen ca. 5-fach höheren ATP-Pool im Vergleich zu *Streptococcus mutans* auf.

5.4. Beeinflussung des Wachstums und des ATP-Pools von *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus mutans* durch Natriumfluorid

Um direkte Vergleiche zwischen fluorid- und nichtfluoridhaltigen Medien zu erhalten, ohne dabei der Problematik der Normierung ausgesetzt zu sein, wurde beim Versuch 3N von *Staphylococcus epidermidis* eine Parallelkultur angesetzt, der 10 mM NaF zugegeben wurde und die im folgenden als $3F_{10}$ bezeichnet wird. Bei *Streptococcus mutans* wurde in Versuch 4N ähnlich verfahren, hier bildete die Kultur $4F_1$ einen Parallelansatz mit 1 mM NaF, die Kultur $4F_{10}$ einen Parallelansatz mit 10 mM NaF.

Fig. 6 und 7: Wachstumskurven und ATP-Pool von *Streptococcus mutans*

Fig. 8 zeigt den Vergleich der Wachstumskurven in den Versuchen 3N und $3F_{10}$. Es ist offensichtlich, daß der 10 mM NaF-Zusatz zum Schaedler Medium eine Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus epidermidis* bedingt. Fig. 9 zeigt den Verlauf der dazugehörigen ATP-Pool Kurven.

Fig. 10 gibt das Wachstum von *Streptococcus mutans* in den Ansätzen 4N, $4F_1$ und $4F_{10}$ mit ihren unterschiedlichen NaF-Zusätzen wieder. Es ist erwartungsgemäß zu ersehen, daß eine steigende Fluoridkonzentration in den Medien eine steigende Hemmung des Bakterienwachstums hervorruft. BROWN et al. (1979) und THIBORDEAU und MARQUIS (1980) beschreiben korrespondierende Wachstumshemmungen durch NaF bei *Streptococcus mutans*, die sich bezüglich der NaF-Konzentrationen als auch des Ausmaßes der Hemmung mit den vorliegenden Ergebnissen decken. BROWN et al. (1979) beschreiben weiter fluoridsensitive und fluoridresistente Stämme bei *Streptococcus mutans*.

Vergleicht man die Fluoridbeeinflussung bei *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus mutans*, so ist bei *Streptococcus mutans* eine stärkere Wachstumshemmung durch Fluorid festzustellen.

Weitere, hier nicht explizit aufgeführte Versuche ergaben, daß auch die Intensität der Hemmung durch Fluorid bei gleichen Bakterienstämmen von der Vorgeschichte der untersuchten Kulturen abhängig ist.

Fig. 11 zeigt den Verlauf der ATP-Pool Kurven zu den Ansätzen 4N, $4F_1$ und $4F_{10}$. Vergleicht man die einzelnen Wachstumskurven von *Streptococcus mutans* mit den dazugehörigen ATP-Pool Kurven, so ist mit zunehmender Hemmung - Steigerung des Fluoridgehaltes im Medium - keine proportionale Reaktion des ATP-Pools verbunden. Der ATP-Pool von 4N liegt durchschnittlich am niedrigsten in den zu vergleichenden Kurven, der von $4F_1$ am höchsten und der von $4F_{10}$ nimmt eine Mittelstellung ein.

Fig. 8 und 9: Wachstumskurven und ATP-Pool-Schwankungen von *Staphylococcus epidermidis* bei Fluoridzusatz

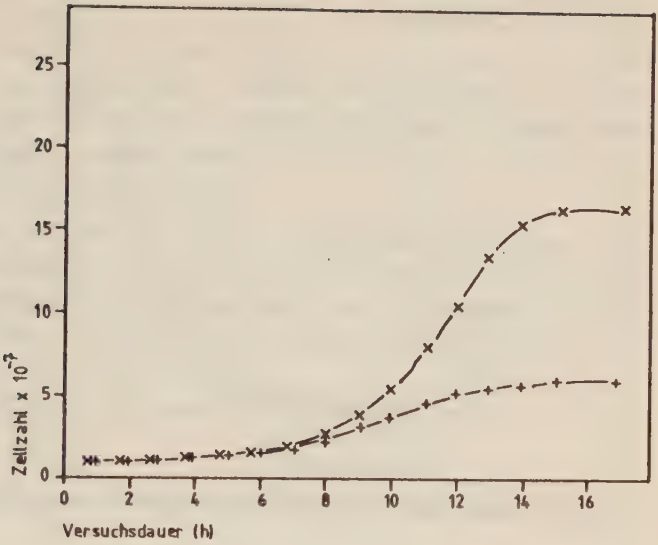


Fig. 8 Wachstumskurven im Fluoridvergleich Versuch 3N - $3F_{10}$

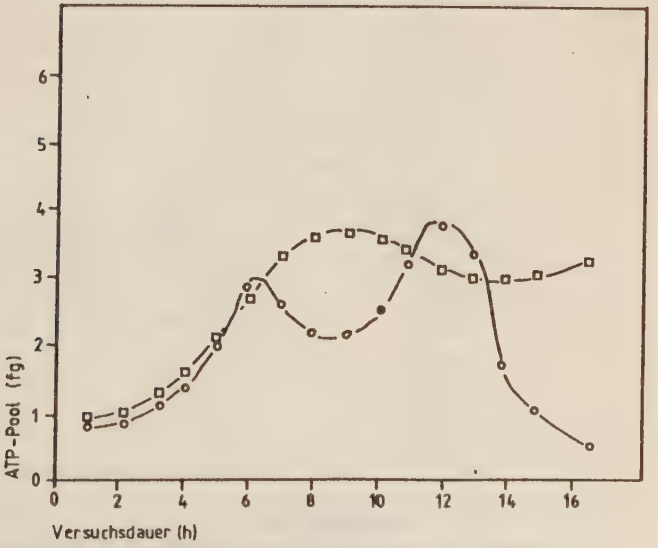


Fig. 9 ATP-Pool im Fluoridvergleich Versuch 3N - $3F_{10}$

× Zellzahl Schaedler rein 3N
+ Zellzahl Schaedler + 10mM NaF $3F_{10}$
○ ATP-Pool Schaedler rein 3N
□ ATP-Pool Schaedler + 10mM NaF $3F_{10}$

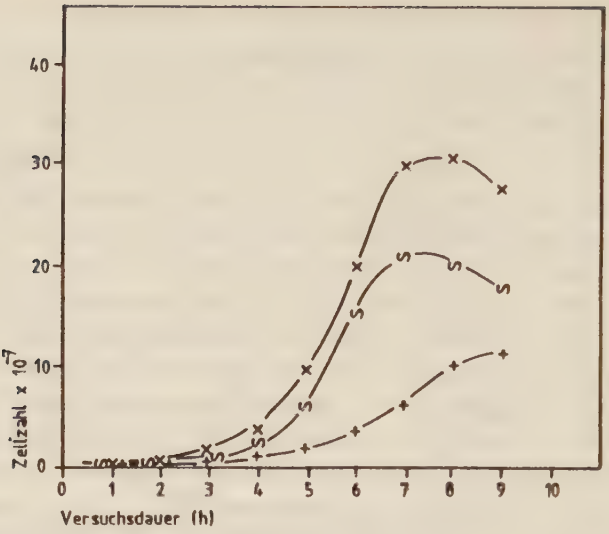


Fig. 10 Wachstumskurven im Fluoridvergleich Versuch 4N-$4F_1$-$4F_{10}$

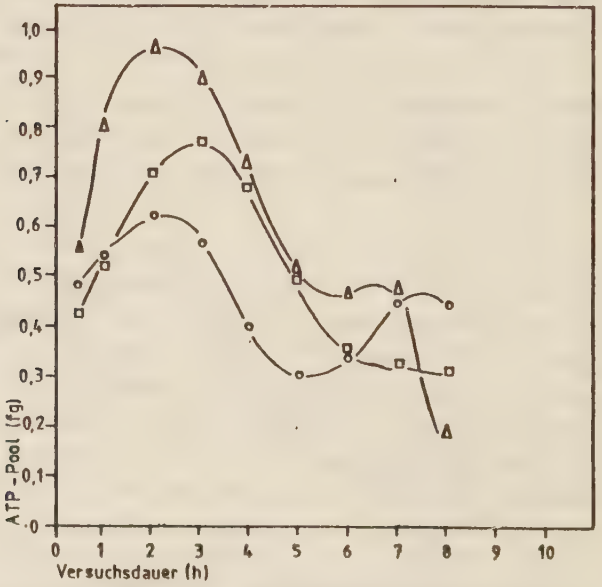


Fig. 11 ATP-Pool im Fluoridvergleich Versuch 4N-$4F_1$-$4F_{10}$

× Zellzahl Schaedler rein 4N
ᔕ Zellzahl Schaedler + 1mM NaF $4F_1$
\+ Zellzahl Schaedler + 10mM NaF $4F_{10}$
○ ATP-Pool Schaedler rein 4N
Δ ATP-Pool Schaedler + 1mM NaF $4F_1$
□ ATP-Pool Schaedler + 10mM NaF $4F_{10}$

Man kann die größer werdende Wachstumshemmung durch den steigenden Fluoridgehalt im Medium auch als abnehmende Viabilität der Bakterien interpretieren. Auf diese abnehmende Viabilität reagiert der Verlauf des entsprechenden ATP-Pools demgemäß nicht proportional. Dieser Befund wurde bei Parallelkulturen zu Versuch 5N erhärtet, da dieser Versuch jedoch keine prinzipiell neuen Erkenntnisse lieferte, wurde auf seine Darstellung verzichtet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß diese empirischen Daten belegen, daß aus dem ATP-Pool keine direkten Rückschlüsse auf die Viabilität gezogen werden können. Diese Feststellung soll im folgenden Kapitel theoretisch erhärtet werden.

Fig. 10 und 11: Wachstumskurven und ATP-Pool-Schwankungen von *Streptococcus mutans* bei Fluoridzusatz

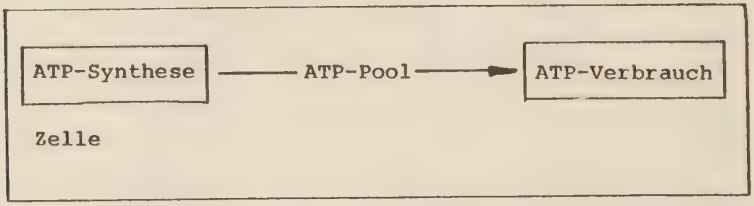
6. THEORETISCHE ERÖRTERUNGEN ZUM ATP-POOL

6.1. Das Wesen des ATP-Pools

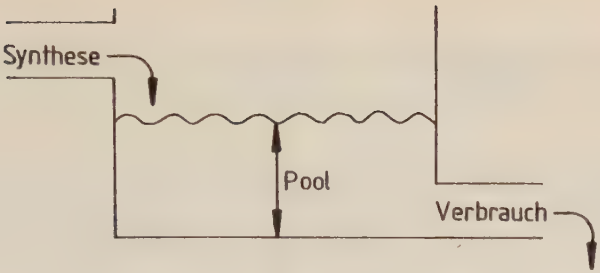
Um dem Wesen des ATP-Pools in einer Diskussion überhaupt gerecht zu werden, müssen dazu einige theoretische Gedanken erörtert werden. HARRISON und MAITRA (1969) als auch LEHNINGER (1974) sowie CHAPMAN und ATKINSON (1977) stellen eine sehr kurze Umschlagszeit des ATP-Pools, im folgenden kurz als Turnovertime bezeichnet, in bakteriellen Zellen fest. HARRISON und MAITRA schreiben dazu: "... der sogenannte Pool repräsentiert nur den im Gleichgewicht befindlichen Wert, auf den der ATP-Gehalt reguliert ist, und kann nicht als ATP-Reserve angesehen werden."

Wenn nun der ATP-Pool nicht als eine Reserve angesehen werden kann, was stellt er dann dar?

Abstrakt betrachtet ist er die Menge an ATP, die sich zwischen den Zellorganellen befindet, die ATP synthetisieren, und denen, die ATP verbrauchen. Der ATP-Pool stellt also kein Maß für den ATP-Umsatz in der Zelle dar, denn der Umsatz ist mit der Umschlagsgeschwindigkeit des ATP-Pools verknüpft. Das Maß für diese Umschlagsgeschwindigkeit ist die Turnovertime.



Ein Analogiemodell zur gedanklichen Veranschaulichung stellt das Wasserbecken mit Zulauf (ATP-Synthese) und Abfluß (ATP-Verbrauch) dar:



Die Höhe des Wasserspiegels repräsentiert den ATP-Pool. Dieser Wasserspiegel selbst sagt nichts über die durch das Bekken fließende Wassermenge aus, dieser Wasserdurchfluß kann bei gleichem Wasserspiegel tropfenweise als auch sintflutartig verlaufen.

6.2. Die Turnovertime des ATP-Pools

Biologisch gesehen wird der ATP-Pool durch Steuerungsmechanismen auf ein Niveau eingeregelt, das in den vorliegenden Experimenten den Verlauf der ATP-Pool Kurve darstellt.

Unbiologisch, aber mathematisch lassen sich folgende Überlegungen im Sinne einer dem "Sägezahn-Modell" ähnlichen Betrachtungsweise anstellen. Nimmt man theoretisch an, die ATP-Synthese (der Wasserzulauf in obigem Modell) sei nicht wie biologisch kontinuierlich, sondern bei vorhandenem ATP-Pool gleich Null, dann sinkt der ATP-Pool (der Wasserspiegel) langsam auf das Nullniveau, je nachdem, wie stark der ATP-Verbrauch in der Zelle (der Wasserabfluß) ist. In dem Augenblick, in dem alles ATP verbraucht ist - konstanten Verbrauch vorausgesetzt - soll der ATP-Pool schlagartig wieder auf seine volle Größe (ursprüngliche Wasserhöhe) über die Synthese aufgefüllt werden, dieser Vorgang soll keine Zeit benötigen.

Nun kann man die Zeit bestimmen, die zwischen zwei solchen Füllungen des ATP-Pools liegt, sie ist gleich der Zeit, die der ATP-Pool von seiner vollen Höhe auf Null abzusinken be-

nötigt. Diese Verbrauchszeit entspricht der Turnovertime des ATP-Pools; der Begriff geht auf HARRISON und MAITRA (1969) zurück.

Für die Synthese eines neuen Bakteriums, also für eine volle Zellteilung, benötigt die Zelle eine bestimmte Menge an ATP, dieser Bedarf sei Φ ng ATP. Dieser ATP-Bedarf Φ für eine Zellteilung muß - zumindest als Durchschnittswert in einer großen Bakterienkultur - in der Verdopplungszeit t eines Bakteriums von der Zelle selbst synthetisiert werden. Die Verdopplungszeit t läßt sich aus der Wachstumskurve bestimmen, indem man den Zuwachs an Bakterien pro Zeiteinheit - die erste Ableitung der Bakterienzahl nach der Zeit - durch die momentan vorhandene Bakterienzahl dividiert; aus diesem Wert kann bei endlich großen Zeiteinheiten auf die Verdopplungszeit t geschlossen werden, in der sich die momentan vorhandene Bakterienanzahl bei gleichbleibendem Wachstum verdoppelt.

In dieser Verdopplungszeit t wird wiederum der ATP-Bedarf Φ durch den ATP-Pool bereitgestellt, letzterer macht während dieser Zeit folgende Anzahl von Umsätzen:

$$\frac{\text{ATP-Bedarf } \Phi}{\text{ATP-Pool}} = \text{Anzahl der Umsätze des ATP-Pools}$$

Dividiert man nun die Verdopplungszeit t durch die Anzahl der Umsätze des ATP-Pools, so ergibt sich die Zeit eines Umsatzes des ATP-Pools, die Turnovertime:

$$\frac{\text{Verdopplungszeit t} \times \text{ATP-Pool}}{\text{ATP-Bedarf}} = \text{Turnovertime des ATP-Pools}$$

Auch wenn der ATP-Bedarf Φ für eine Zellteilung nicht bekannt ist, läßt sich durch folgende Proportionalitätsgleichung trotzdem eine Aussage über das Verhalten der Turnovertime während einer Wachstumskurve machen:

Verdopplungszeit t x ATP-Pool ∿ Turnovertime des ATP-Pools

Deren Verlauf zeigt Fig. 12 für *Streptococcus mutans* im Versuch 6N. Die Kurve konnte sogar zeitlich geeicht werden, da der ATP-Bedarf ϕ für eine Zellteilung (unter allem Vorbehalt einer Abschätzung) grob aus einer Tabelle bei LEHNINGER (1974) mit ca. 3,3 pg ATP ermittelt werden kann.

Diese Abschätzung führt zu Zeiten für die Turnovertime von weniger als einer Sekunde für *Streptococcus mutans*. Bei *Staphylococcus epidermidis* ist die Turnovertime bei einigen wenigen Sekunden anzusetzen, da der ATP-Pool im Durchschnitt 5 mal so groß ist.

HARRISON und MAITRA (1969) bestimmten die Turnovertime bei *Klebsiella aerogenes* experimentell in einem Chemostat über Gasanalysen, sie geben einen Wert von 1 s für die Turnovertime an, der im Laufe einer Wachstumskurve Schwankungen unterliegt.

Bei der bisherigen Betrachtungsweise des ATP-Umsatzes mittels obiger Bestimmung wurde davon ausgegangen, daß während einer Wachstumskurve ATP von der Zelle nur für ihre Vermehrung gebraucht wird, daß man also umgekehrt von der Vermehrung auf den ATP-Umsatz schließen kann. Dabei wurde außer acht gelassen, daß die Zelle für die Unterhaltung ihrer eigenen Lebensvorgänge auch bei nicht vorhandenem Wachstum ATP im Grundumsatz benötigt und damit auch umsetzt.

Es stellt sich hier die Frage, wie sich ATP-Grundumsatz der Zelle und ATP-Bedarf zur Zellteilung größenordnungsmäßig zueinander verhalten. In der stationären Phase sind zwar noch wenige Zellteilungen zu beobachten, doch wird hier der ATP-Grundumsatz dominieren. Je höher die Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Wachstumsphase ist, desto mehr wird die ATP-Turnovertime von der Wachstumsrate abhängig sein, weil der ATP-Grundumsatz im Vergleich zum ATP-Bedarf für die Zellteilung immer mehr in den Hintergrund tritt. CHAPMAN und ATKINSON (1977) geben an, daß für die Biosynthese von makromolekularen Zellbestandteilen je nach Wachstums-

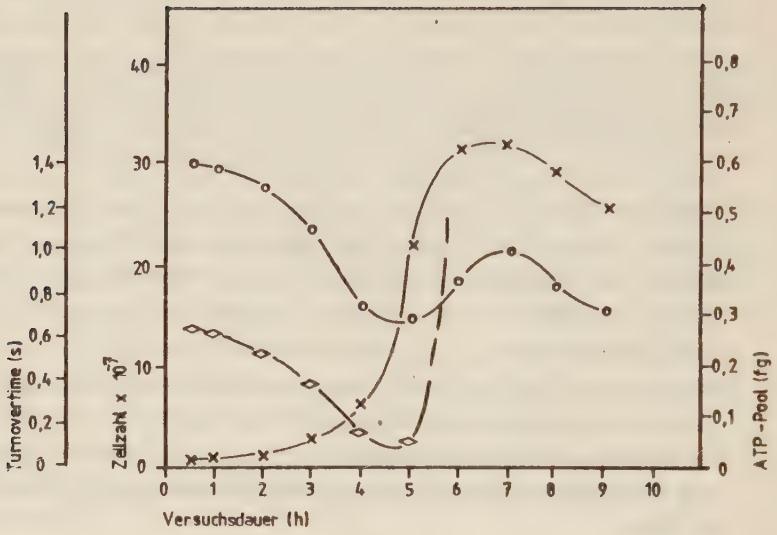


Fig. 12 Turnovertime Versuch 6N

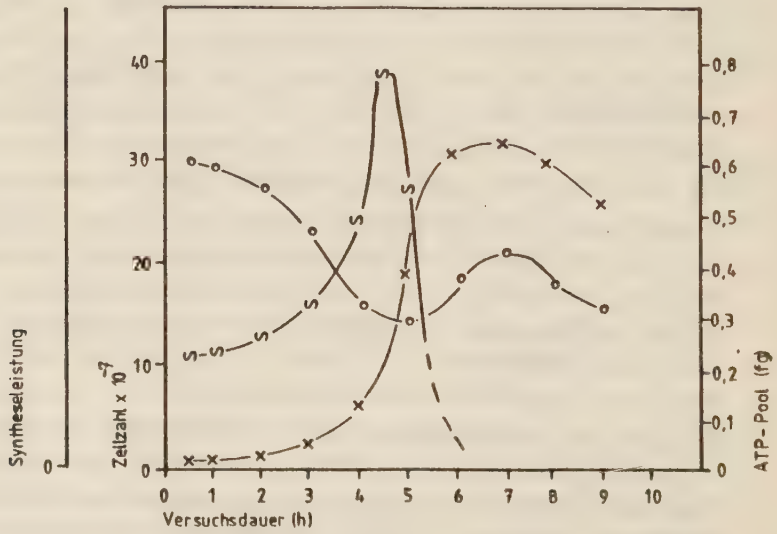


Fig. 13 Syntheseleistung Versuch 6N

× Zellzahl
o ATP-Pool
◇ Turnovertime
s Syntheseleistung

geschwindigkeit 10-50 % des ATP-Umsatzes benötigt werden.

Was bedeutet diese Angabe für obige Bestimmung der Turnovertime? In der exponentiellen Wachstumsphase des in Fig. 12 dargestellten Versuches ist bei 4 h 30 min die Zellteilungsrate und damit die Wachstumsgeschwindigkeit maximal. Man kann zu diesem Zeitpunkt unter Berücksichtigung obiger Angabe von CHAPMAN und ATKINSON (1977) davon ausgehen, daß 50 % des ATP-Bedarfs für die Zellteilung, 50 % für den Grundumsatz benötigt werden.

In der Berechnung der Turnovertime wurde ja nur vom ATP-Bedarf Φ für die Zellteilung ausgegangen, dazu muß noch der ATP-Bedarf für den Grundumsatz berücksichtigt werden. Daher muß die Turnovertime des Gesamt-ATP-Umsatzes noch einmal um den entsprechenden Faktor vermindert werden.

CHAPMAN und ATKINSON (1977) geben in ihrer Literaturübersicht für im Wachstum befindliche Bakterien eine Turnovertime des ATP-Pools von 0,19 - 7,5 s, für nichtwachsende Bakterien eine Turnovertime von 4,6 - 180 s an, diese Angaben beruhen auf - im Vergleich zum hier gezeigten Ansatz - relativ aufwendigen Messungen von Stoffwechselparametern.

In der weiteren Interpretation der Turnovertime des ATP-Pools wird ihr exakter Wert zu irgendeinem Zeitpunkt in der Wachstumskurve für die methodische und prinzipielle Betrachtung der ATP-Messung nicht von der Bedeutung sein wie die Tatsachen, daß die Turnovertime im Sekundenbereich liegt und von der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien abhängig ist, also keine konstante Größe darstellt.

Fig. 12 und 13: Turnovertime des ATP-Pools sowie Syntheseleistung von *Streptococcus mutans* in Vergleich zur Wachstums- und ATP-Pool-Verlaufskurve

6.3. ATP-Umsatz und Syntheseleistung

Wie aus Fig. 12 zu ersehen ist, ist die Turnovertime nicht konstant, andere nicht dargestellte Versuche liefern gleiche Ergebnisse. Folglich schwankt nach 6.1. auch der ATP-Umsatz in der Zelle. Der Mehrbedarf an ATP der Zelle während ihrer exponentiellen Wachstumsphase wird durch einen schnelleren Umschlag des ATP-Pools gedeckt - nichts weiter bedeutet ja die Verkürzung der Turnovertime. Daher läßt der ATP-Pool keinen Schluß auf den ATP-Umsatz zu.

Dieser Zusammenhang tritt in der Betrachtung der Syntheseleistung eines Bakteriums noch deutlicher hervor, und es werden so die bisherigen Aussagen noch einmal bekräftigt. Die Syntheseleistung eines Bakteriums kann aus der Wachstumskurve bestimmt werden:

$$\frac{\Delta \text{ Zellzahl}}{dt} \times \frac{1}{\text{Zellzahl}} = \text{Syntheseleistung pro Bakterium}$$

In Fig. 13 wird diese Syntheseleistung mit dem ATP-Pool am Beispiel des Versuchs 6N verglichen. Dabei zeigt sich, daß nach einer Versuchsdauer von 4 h 30 min die Syntheseleistung der Bakterien enorm steigt, obwohl sich keine dementsprechende Änderung des ATP-Pools ergibt. Mit der Steigerung der Syntheseleistung muß nach 6.2. eine Steigerung des ATP-Umsatzes einhergehen. Diese Steigerung des ATP-Umsatzes, des ATP-Bedarfs, wird - wie dargelegt - von der Zelle nicht mit der Erhöhung des ATP-Pools, sondern mit der Verkürzung der ATP-Turnovertime beantwortet.

Kann der ATP-Pool pro Mikroorganismus ein Maß für die Viabilität von Bakterienzellen sein?

Empirisch ergab sich in 5.4. im Zusammenhang der unterschiedlichen Hemmung mit verschiedenen Fluoridkonzentrationen die Verneinung dieser Frage. Theoretisch wird diese Aussage erhärtet, weil, wie gezeigt, der ATP-Pool nicht mit dem ATP-Umsatz einer Zelle korreliert, also auch nicht mit deren

Viabilität. ATP-Pool und ATP-Umsatz sind über die nicht konstante Turnovertime des ATP-Pools verbunden.

6.4. Konsequenzen aus der im Sekundenbereich liegenden Turnovertime des ATP-Pools

1. Die kurze Turnovertime des ATP-Pools zeigt bei dem hohen ATP-Umsatz der Zelle die Effizienz der biologischen Regelmechanismen, die ATP-Synthese und ATP-Verbrauch steuern und somit diesen ATP-Pool relativ konstant belassen.

2. Der ATP-Pool kann keinen "ATP-Vorrat" der Zelle darstellen, dies soll noch einmal an einer Abschätzung verdeutlicht werden. Wenn auch der ATP-Pool, wie in Versuch 1N (vgl. Fig. 2) zu sehen, innerhalb von 2 h von 6 auf 2 fg ATP kraß herabsinkt, so stehen die so für die Zelle gewonnenen 4 fg ATP in keinem Verhältnis zu dem ATP-Umsatz während dieser zwei Stunden, wenn man bedenkt, daß der ATP-Pool selbst in Sekunden für diesen ATP-Umsatz umgesetzt wird.

3. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene ATP-Pool ist der Durchschnittswert aller in der Kultur vorhandenen Bakterien. Es ist aber nur zu verständlich, daß sich die einzelnen Bakterien in den ganz unterschiedlichen Phasen g_0, g_1 und g_2 ihres Teilungszyklus nebeneinander befinden. Somit lassen sich Aussagen einer Korrelation des ATP-Pools und aller aus ihm abgeleiteten Größen einer einzelnen Bakterienzelle zu ihrem Zustand in ihrem Teilungszyklus nicht machen. Der in dieser Arbeit ermittelte ATP-Pool kann nur ein Durchschnittswert der ATP-Pools von Millionen von Einzelbakterien sein. Somit lassen die Verläufe aller aus dem ATP-Pool ermittelten Kurven keine Einzelinterpretation des ATP-Haushaltes einer Bakterienzelle zu, so interessant diese Frage auch erscheinen mag.

4. Meßtechnisch stellt sich an dieser Stelle bei einer Turnovertime im Sekundenbereich folgende Frage: Mißt man mit der

dargestellten Methode der Biolumineszenz wirklich den ATP-Pool der Zelle in den Kulturbedingungen des Mediums - oder ist der Meßwert ein artifizielles Produkt, beeinflußt durch die Meßmethodik als solche?

Erst jetzt tritt die in 4.3. aufgezeigte Meßproblematik auf dem Hintergrund der kurzen Turnovertime voll in Erscheinung. In den 30-40 s zwischen Entnahme der Probe und dem eigentlichen Meßvorgang wird der ATP-Pool theoretisch ungefähr - je nach Bakterienart - 30 mal umgesetzt. Es ist meßtechnisch nicht abzuklären, inwieweit die Zelle in dieser Zeit ihren ATP-Pool längst den neuen Bedingungen der Meßmanipulationen angepaßt hat.

Von großer Bedeutung ist insbesondere die Rolle des NRBs als Nucleotid Releasing Reagens: Wie schnell werden z.B. nach Perforation der Bakterienzellmembranen die ATP produzierenden Zellorganellen in ihrer Aktivität gestoppt? Ein Nachhinken dieser Blockierung von der Dauer einer Turnovertime hätte schon eine Verdopplung des zu messenden ATP-Pools zur Folge!

7. REAKTIONEN DES ATP-POOLS ALS ANTWORT DER BAKTERIEN AUF MESSMANIPULATIONEN

7.1. Verdünnen von Bakterienkulturen: Auswirkungen auf den ATP-Pool

Wie deutlich gezeigt werden konnte, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschätzt werden, inwieweit der ATP-Size durch die Meßmanipulationen zu einem artifiziellen Wert wird, der für die Bestimmung des ATP-Pools der zu untersuchenden Bakterien unter Kulturbedingungen nicht mehr aussagefähig ist. Vor jeglicher ATP-Messung lag, wie in 4.4. erörtert, ein Verdünnungsschritt, der die Menge bakteriellen ATPs in den Meßbereich des Lumacounters transformierte und der die inhibierenden Faktoren der Biolumineszenzreaktion aus den Nährmedien unter ihre Hemmschwelle drückte. Um die Konsequenzen aus diesem Verdünnungsschritt auf den Hintergrund des oben erwähnten Problemkreises darzustellen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Während einer Wachstumskurve einer Bakterienkultur wurden zu verschiedenen Zeitpunkten eine Bakterienprobe aus der Kultur entnommen - in Fig. 14 als Beispiel nach 3 h und 9 h - und 1:100 in frischem Schaedler Medium verdünnt, wie dies bereits in Material und Methoden für jede einzelne ATP-Bestimmung beschrieben worden ist. Der ATP-Size dieser verdünnten Probe wurde nun im Minutenabstand gemessen. Wie aus den Inserts in Fig. 14 zu entnehmen ist, zeigte sich dabei, daß während der lag-Phase und der log-Phase keine Veränderung des ATP-Size auftrat. Im Gegensatz dazu stieg nach dem Verdünnungsschritt der ATP-Size solcher Bakterien, die sich in ihrer Wachstumskultur bereits in der stationären Phase befanden, während ca. 10 min oft auf das Doppelte.

Es ist nicht anzunehmen, daß sich die Bakterienzahl während dieser Zeit in gleichem Maße in der verdünnten Probe vergrößert, zeigen doch auch die Wachstumskurven der Versuche 1N -

5N zurückgerechnet auf die ersten 10 Minuten nach Umimpfen (= Verdünnung) keinen Anstieg der Zellzahl. Zudem tritt das beschriebene Phänomen auch während des steilen Anstiegs der Wachstumskurve noch nicht in Erscheinung. Wenn der ATP-Size einer Bakterienprobe steigt, ohne daß sich im gleichen Zeitraum die in der Probe befindliche Bakterienzahl entsprechend vergrößert, muß dies durch den Anstieg des ATP-Pools der Bakterien bedingt sein.

Der Anstieg des ATP-Pools ist vom Zeitpunkt der Verdünnung abhängig, er ist am deutlichsten im Beginn der stationären Phase ausgeprägt und wird dann im weiteren Verlauf dieser Phase immer flacher. Meßtechnische Effekte scheiden mit hoher Sicherheit für die Erklärung dieses Phänomens aus, da dieser Anstieg kontinuierlich erfolgt und biologischen Gesetzmäßigkeiten bezüglich der Bakterienkultur unterliegt.

Es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Anstieg des ATP-Pools eine Antwort der Bakterien auf die krasse Medienveränderung durch die Verdünnung mit unverbrauchtem Schaedler Medium ist. In der stationären Phase einer Wachstumskurve sinkt, wie gezeigt werden konnte, der ATP-Pool ab, das Medium läßt durch Anhäufung von Zelltoxinen und durch verbrauchtes Substratangebot kein Bakterienwachstum mehr zu. Die Verdünnung in neuem Medium erlaubt es den Bakterien, erneut in Richtung Zellwachstum zu reagieren. Würde man die verdünnte Kultur weiter beobachten, so würde nach Stunden in ihr Zellwachstum zu erkennen sein. Als erste Antwort nach der Verdünnung zeigen die aus einer stationären Wachstumsphase stammenden Bakterien eine Erhöhung ihres ATP-Pools in dem neuen Medium.

Für die Versuche 1N - 5N der vorliegenden Arbeit läßt sich aus dem geschilderten Verdünnungseffekt entnehmen, daß die

---

Fig. 14: Reaktion des ATP-Pools von *Streptococcus mutans* bei Verdünnung mit Medium

Fig. 15: Reaktion des ATP-Pools von *Streptococcus mutans* mit fluoridhaltigem Medium

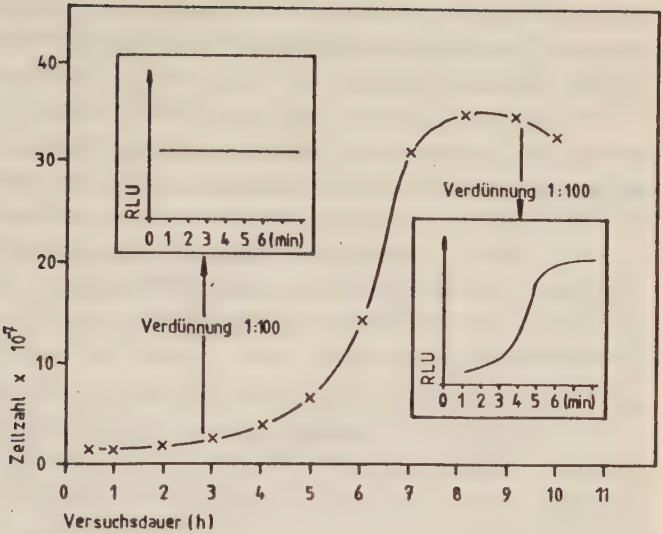


Fig. 14 Verdünnungseffekte

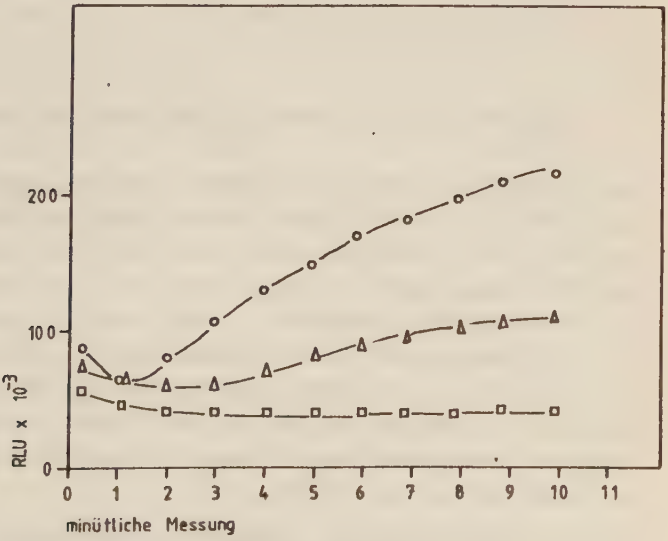


Fig. 15 Verdünnungsexperiment mit Flourid

× Zellzahl

o RLU Schaedler rein

Δ RLU Schaedler + 1mM NaF

□ RLU Schaedler + 10mM NaF

Verdünnung von Meßproben in Schaedler Medium vor jeder ATP-Messung (vgl. 4.3. und 6.4.4.) während der lag- und der log-Phase der Wachstumskurven keinen Einfluß auf den zu bestimmenden ATP-Pool hat. Wurde in der Messung der Wachstumskurve die stationäre Phase der Bakterien erreicht, so trat der Effekt des Anstiegs des ATP-Pools durch die Verdünnung der Bakterien vor der ATP-Messung ebenfalls auf. Methodisch ist für die Messung der Wachstumskurven nach Erreichen der stationären Phase nachzutragen, daß dieser Anstieg des ATP-Pools mit mehreren im Minutenabstand folgenden ATP-Messungen erfaßt und mathematisch auf den Zeitpunkt der Verdünnung zurückextrapoliert wurde.

Bei Versuchsbeginn werden die Bakterien der Vorkultur b in neuem Medium der Versuchskultur verdünnt. Hierbei tritt das Ansteigen des ATP-Pools in der neuen Kultur während der ersten 10 Minuten nicht in dem Maße in Erscheinung, da sich die Bakterien der Vorkultur b noch nicht in der stationären Phase befinden (vgl. Fig. 5) und die Verdünnung in neuem Medium maximal nur 1:20 beträgt.

7.2. Verdünnungsexperimente in verschiedenen Medien

Aus der experimentellen Beobachtung, daß der ATP-Anstieg kurz nach Erreichen der stationären Phase der zu verdünnenden Bakterien am deutlichsten ausgeprägt ist und dann mit dem Alterungsprozeß der Bakterien in der stationären Phase sich immer flacher gestaltet, ergibt sich die Schlußfolgerung, daß der Anstieg des ATP-Pools nach Verdünnung mit neuem Medium von der Reaktionsfähigkeit der Bakterien abhängig ist, denn die Viabilität der Bakterien - im definierten Sinne der Problemstellung - nimmt in ihrem Fortschreiten in der stationären Phase ständig ab.

Nach den bisherigen sehr kritischen Anmerkungen zur Methode der Biolumineszenz stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob nicht das geschilderte Phänomen des Anstiegs der ATP-Pools

als ein Maß der Viabilität gedeutet werden kann. Kann man dem verdünnenden Medium verschiedene Stoffe beigeben und aus dem Ausmaß und dem Verlauf des Anstieges des ATP-Pools auf die Beeinflussung der Viabilität der Bakterien durch die zugesetzten Stoffe schließen?

Im Rahmen dieser Arbeit lag es nahe, ein solches Verdünnungsexperiment mit *Streptococcus mutans* in den Verdünnungsmedien

- Schaedler Medium rein
- Schaedler Medium + 1 mM NaF
- Schaedler Medium + 10 mM NaF

durchzuführen, da die Wachstumshemmung dieser Stoffe auf *Streptococcus mutans* bereits ermittelt wurde (vgl. 5.4.). Das Ansteigen des ATP-Pools in dem oben erwähnten Verdünnungsexperiment mit verschiedenen Fluoridkonzentrationen zeigt Fig. 15. Dabei fällt die Korrelation zu den in Fig. 10 gezeigten Wachstumskurven der Versuche 4N, $4F_1$ und $4F_{10}$ auf. Sie bestätigt, daß die Steilheit des Anstiegs des ATP-Pools in einem Verdünnungsexperiment als Viabilitätskriterium der Bakterien in dem verdünnten Medium gedeutet werden kann.

Es sind sicherlich weitere experimentelle Untersuchungen nötig, um die Korrelation zwischen dem ATP-Pool-Anstieg nach Verdünnung und der Viabilität zu erhärten und die allgemeine Aussagefähigkeit eines solchen Verdünnungsexperimentes zu bestimmen. Entsprechende Versuche sind bereits angelaufen, doch würde ihre Darstellung den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen.

8. ALLGEMEINE DISKUSSION: MÖGLICHKEITEN DES EXPERIMENTELLEN EINSATZES DER BIOLUMINESZENZ

Da es oftmals sehr schwierig ist, Lebendzellzahlbestimmungen konventionell exakt durchzuführen (ROBRISH et al. 1978, BÖSMANN 1979 und KEMP 1979), lautet die eingangs gestellte Fragestellung: Führt der ATP-Size einer Probe dividiert durch den ATP-Pool des (der) sich in der Probe befindlichen Bakterienstammes (-stämme) zu einer exakten Zahlenangabe der lebenden Bakterien in der zu untersuchenden Probe?

Diese Art des Einsatzes der Biolumineszenz muß äußerst kritisch betrachtet werden, weil - wie gezeigt werden konnte -

- der ATP-Pool eines einzelnen Bakteriums im Laufe der Wachstumskurve um ein Vielfaches schwanken kann (FORREST 1965, COLE 1967, vgl. 5.2. und 5.3.)
- die Methode rein experimentell Fehlerquellen in sich birgt (vgl. 4.)
- zur Bestimmung des ATP-Poosl eines einzelnen Bakteriums eben wieder die konventionellen Referenzmethoden verwendet werden müssen, also die Bestimmung des ATP-Pools prinzipiell mit diesen Methoden und deren Fehlern verbunden ist (vgl. 4.6.).

Es ist zwar richtig, daß die konventionelle Bestimmung der Lebendzellzahl in einer Reinkultur und die anschließende Ermittlung des ATP-Pools mit einer gewissen Genauigkeit durchführbar ist, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Diese Genauigkeit hat aber dort ihre Grenzen, wo die Lebendzellbestimmung mit Hilfe der Biolumineszenz auf Biotope, z.B. Plaque, angewendet wird, weil in solchen Biotopen

- bakterielle Mischkulturen vorliegen, deren Einzelzusammensetzung nicht bekannt ist, deren einzelne Bakterienarten jedoch einen unterschiedlichen ATP-Pool aufweisen
- sogar Serotypen eines Bakterienstammes einen unterschiedlichen ATP-Pool zeigen (RIEDL 1981)
- über den Stoffwechselzustand der Bakterien, dessen Einfluß

in der vorliegenden Arbeit ausführlich dargestellt wurde, keine Aussage gemacht werden kann

- der Einfluß des im Biotop nicht bestimmbaren Nährstoffangebotes auf den ATP-Pool unbekannt ist - Untersuchungen von FORREST (1965) zeigen, welchen Beeinflussungen der ATP-Pool durch unterschiedliche Nährmedien ausgesetzt ist
- die Einwirkungen von äußeren Faktoren, z.B. von Medikamenten in klinischen Untersuchungen (CONN et al. 1975), in großen Maßen die Biolumineszenzreaktion beeinflussen.

Somit bedarf das Argument, die Biolumineszenz sei eine schnelle Methode zur quantitativen Lebendzellbestimmung insbesondere bei geringen Mengen an Probenmaterial aus Biotopen nicht definierter Zusammensetzung, einer äußerst kritischen Betrachtungsweise.

Aussagen über die Viabilität von Bakterien mit Hilfe des ATP-Pools sind nicht möglich, da, wie hergeleitet werden konnte, der ATP-Umsatz, der als ein Maß für die Zellaktivität und damit auch definitionsgemäß für die Viabilität angesehen wurde, nicht dem ATP-Pool proportional ist. Vielmehr wird bei hoher Syntheseleistung der ATP-Bedarf der Zelle durch eine Verkürzung der Turnovertime aus dem ATP-Pool gedeckt, dies bedeutet, daß der ATP-Pool bei großem ATP-Bedarf schneller umgesetzt wird.

Kennt man die prinzipiellen Fehlerquellen und die experimentellen Schwierigkeiten der Biolumineszenzmethode und weiß sie durch ein geschicktes experimentelles Vorgehen sogar teilweise auszuschalten, so ergeben sich aus der ATP-Messung an Bakterien interessante Anwendungsmöglichkeiten.

Als ein Beispiel dafür mögen die Verdünnungsexperimente angegeben werden. In ihnen entfällt jegliche Zellzahlbestimmung durch konventionelle Methoden, der augenblickliche Stoffwechselzustand der Bakterien braucht nicht im Einzelfall bestimmt werden, da mit stets der gleichen Bakterienkultur gearbeitet wird und sich auch prinzipielle Fehlerquellen durch den Vergleich aufheben.

In dieser Richtung des experimentellen Vorgehens lassen sich sicherlich noch mehr interessante Anwendungen der Biolumineszenz ergeben.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Meßmethodik der ATP-Bestimmung mit Hilfe der Biolumineszenz auf ihre Problematik, Praktikabilität, Einsatzmöglichkeit und Aussagefähigkeit untersucht.

Unter verschiedenen Kulturbedingungen wurden Wachstumskurven von *Streptococcus mutans* und *Staphylococcus epidermidis* sowohl mit Hilfe der Biolumineszenz auf ihren ATP-Gehalt untersucht als auch in Referenzverfahren durch Plattierungen und Bakterienzählkammer die Lebendzellzahl bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, daß der ATP-Pool während des Bakterienwachstums nicht konstant ist; es wurden bei *Streptococcus mutans* Schwankungen zwischen 0,3 und 0,6 fg ATP, bei *Staphylococcus epidermidis* Schwankungen zwischen 1 und 6 fg ATP für den ATP-Pool pro Mikroorganismus festgestellt. Deshalb ist die Lebendzellzahlbestimmung über den ATP-Pool zwangsläufig ungenau.

Der Einfluß von NaF als Stoffwechselgift auf den ATP-Pool wurde untersucht und mit den Wachstumskurven korreliert.

Die Umschlagszeit des ATP-Pools wurde aus den Daten der Wachstumskurven und der ATP-Messungen abgeleitet, sie liegt für *Streptococcus mutans* bei ca. 1 s, verändert sich aber während des Verlaufs der Wachstumskurve.

Deshalb gibt der ATP-Pool keinen Hinweis auf die Stoffwechselaktivität bzw. Viabilität der Bakterien. In diesem Zusammenhang wurde die Syntheseleistung der Bakterien mathematisch-graphisch ermittelt und mit dem ATP-Pool verglichen.

Verdünnungseffekte in stationären Bakterienkulturen rufen Veränderungen des ATP-Pools hervor. Diese Veränderungen können als mögliche Viabilitätskriterien ausgenutzt werden.

Entsprechende Messungen, bei denen wiederum NaF als beeinflussende Substanz eingesetzt wurde, wurden durchgeführt. Ihr positives Ergebnis - im Sinne der Ausnutzung der Veränderung des ATP-Pools - ist Grundlage weiterführender Arbeiten.

10. LITERATURVERZEICHNIS

AHRENS, G.: Die Bedeutung der Mundhygiene für die Kariesprophylaxe. Kariesprophylaxe 2, 133 (1980)

ATKINSON, D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 7, 4030 (1968)

BEIGHTON, D. and MC DOUGALL, W.A.: The effects of fluoride on the percentage bacterial composition of dental plaque, on caries incidence, and on the in vitro growth of Streptococcus mutans, Actinomyces viscosus, and Actinobacillus sp.. J. dent. Research 56, 1185 (1977)

BEIGHTON, D. and HAYDAY, H.: The effects of fluoride on the growth of oral streptococci. Microbios 27, 117 (1980)

BITLER, B. and MC ELROY, W.D.: The preparation and properties of cristalline firefly luciferin. Arch. Biochem. Biophys. 72, 358 (1957)

BOEHRINGER: Adenosin-5'-triphosphat Biolumineszenztest mit Luziferase. Aktuelle Biochemie, 2. Auflage (1981)

BÖßMANN, K.: Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung von Karies. Kariesprophylaxe 1, 3 (1979)

BROWN, L.R., HANDLER, S.F., HORTON, I.M., STECKFUß, J.L., DREIZEN, S.: Effect of sodium fluoride on the viability and growth of Streptococcus mutans. J. dent. Research 59, 159 (1980)

BUCHERER, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Fluoreszenzfärbungen toter und lebender Bakterien nach Strugger. Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 106, 5/7, 81 (1943)

BÜTTNER, W.: Die karieshemmende Wirkung von Fluoriden und ihre praktische Anwendung. In: "Prophylaxe" (Peters, S. ed.) Quintessenzverlag, S. 55 (1978)

BUSH, V.N., PICCIOLO, G.L. and CHAPPELLE, E.W.: The effect of growth phase and medium on the use of the firefly adenosine triphosphate assay for the quantitation of bacteria. In: "Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence" (NASA, Publ. No. SP-388) National Aeronautics and Space Administration, Washington, D.C. (1975)

CAPOZZI, L., BRUNETTI, P., NEGRI, P.L. and MIGLIORINI, E.: Enzymatic mechanism of action of some fluorine compounds. Caries Res. 1, 69 (1967)

CHAPMAN, A.G. and ATKINSON, D.E.: Adenine nucleotide concentrations and turnoverrates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. In: "Advances in microbial physiology" 15, 253. Academic Press London and New York, 1977

CHAPMAN, A.G., FALL, L. and ATKINSON, D.E.: Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation. J. Bakteriol. 108, 1072 (1971)

CHAPPELLE, E.W. and LEVIN, G.V.: Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. Biochem. Med. 2, 41 (1968)

CHAPPELLE, E.W., PICCIOLO, G.L. and DEMING, J.W.: Determination of bacterial content in fluids. Methods in Enzymology, Vol. LVII, 65 (1978)

COLE, H.A., WIMPENNY, J.W.T. and HUGES, D.E.: The ATP pool in Escherichia coli. I. Measurement of the pool using a modified luciferase assay. Biochim. Biophys. Acta 445 (1967)

CONN, R.B., CHARACHE, P. and CHAPPELLE, E.W.: Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for bacteria in clinical specimens. Amer. J. Clin. Pathol. 63, 493 (1975)

CORMIER, M.J., HERCULES, D.M. and LEE, J.: "Chemoluminescence and Bioluminescence". Plenum Press, New York (1973)

DEAN, H.T., JAY, P.A., ARNOLD jr., F.A. and ELVOVE, E.: Domestic water and dental caries. Publ. Health Rep. 56, 761 (1941)

DEAN, H.T., ARNOLD jr., F.A. and ELVOVE, E.: Domestic water and dental caries. Publ. Health Rep. 57, 1155 (1942)

DE LUCA, M. and MC ELROY, W.D.: Purification and properties of firefly luciferase, Methods in Enzymology, Vol. LVII, 3 (1978)

DE LUCA, M., WANNLUND, J. and MC ELROY, W.D.: Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luziferase. Analyt. Biochem. 95, 194 (1979)

D'EUSTACHIO, A.J. and JOHNSON, D.R.: Adenosine triphosphate content of bacteria. Fed. Proc. 27, 761 (1968)

D'EUSTACHIO, A.J. and LEVIN, G.V.: Levels of adenosine triphosphate during bacterial growth. Bacteriol. Proc. 67, 121 (1967)

DHOPLE, A.M. and HANKS, J.H.: Quantitative extraktion of adenosine triphosphate from cultiviable and host-grown microbes: Calculation of adenosine triphosphate pools. Appl. Microbiol. 26, 399 (1973)

DISTLER, W., KRÖNCKE, A. and MAURER, G.: Adenosine triphosphate content of human dental plaque as a measure of viable cell mass. Caries Res. 14, 265 (1980)

FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.: Phosphorus compounds of muscle and liver. Science 70, 381 (1929)

FORREST, W.W.: Adenosine triphosphate pool during the growth cycle in Streptococcus faecalis. J. Bakteriol. 90, 1013 (1965)

FREESE, E., FORTNAGEL, P., SCHMITT, R., KLOFAT, W., CHAPPELLE, E. and PICCIOLO, G.: Biochemical genetics of initial sporulation stages. In: "Spores IV" (CAMPBELL, L.L., ed.) 82, American Society for Microbiology, Bethesda, Maryland (1969)

GEHRING, F.: Saccharose-Austauschstoffe in der Kariesprophylaxe. Kariesprophylaxe 3, 1 (1981)

GREEN, A.A. and MC ELROY, W.D.: Crystalline firefly luciferase. Biochem. Biophys. Acta 20, 170 (1956)

GÜLZOW, H.J.: Über die Beeinflussung der Säurelöslichkeit der Schmelzoberfläche durch Aminfluoride. Dtsch. zahnärztl. Z. 21, 290 (1966)

GUGGENHEIM, B.: Die Rolle mikrobieller Zahnbeläge in der Ätiologie von Zahnkaries und parodontalen Erkrankungen. Path. Microbiol. 40, 207 (1974)

HAMILTON, R.D. and HOLM-HANSEN, O.: Adenosine triphosphate content of marine bacteria. Limnol. ocean. 12, 319 (1967)

HARRISON, D.E.F. and MAITRA, P.K.: Control of respiration and metabolism in growing Klebsiella aerogenes. Biochem. J. 112, 647 (1969)

HESS, B.: Control of metabolic rates. In: "Control mechanisms in respiration and fermentation". (Wright, B., ed.) 347, Ronald Press, New York (1963)

HÖJER, H., NILSSON, L., Ånsehn, S. and THORE, A.: In-vitro effect of doxycycline on levels of adenosine triphosphate in bacterial cultures. Scand. J. Infect Dis. Suppl. 9, 58 (1976)

HOBSON, P.N. and SUMMERS, R.: ATP pool and growth yield in Selenomonas ruminantium. J. of Gen. Microbiol. 70, 351 (1972)

HOLM-HANSEN, O.: Determination of microbial biomass in ocean profiles. Limnol. Oceanogr. 14, 740 (1969)

HOLM-HANSEN, O.: ATP levels in algal cells as influenced by environmental conditions. Plant. Cell. Physiol. 11, 689 (1970)

HOLM-HANSEN, O. and BOOTH, C.R.: The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. Limnol. Oceanogr. 11, 510 (1966)

HOLM-HANSEN, O. and PEARL, H.W.: The applicability of ATP determinations for estimation of microbial biomass and metabolic activity. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 29, Suppl. 149 (1972)

HOLMS, W.H., HAMILTON, I.D. and ROBERTON, A.G.: The rate of turnover of the adenosine triphosphate pool of Escherichia coli growing aerobically in simple defined media. Arch. Mikrobiol. 83, 95 (1972)

HUENNEKENS, F.M., and WHITELEY, H.R.: Phosphoric acic anhydrides and other energy-rich compounds. In: "Comparative Biochemistry". (FLORKIN, M. and MASON, H.S., eds.) Vol. I, 107-180, 1960

IMFELD, T.N.: Hemmung des Plaquemetabolismus durch Fluoride. In: "Individuelle orale Präventivmedizin". Fortbildungskurs Zahnärztl. Inst. Zürich 2./3. März 1978

JANTZEN, H.: Das Adenosinphosphat-System während Wachstum und Entwicklung von Acanthamoeba castellanii. Arch. Microbiol. 101, 391 (1974)

KARLSON, P.: "Biochemie". Georg Thieme Verlag (1977)

KASHKET, S., RODRIGUEZ, V.M. and BUNICK, F.J.: Inhibition of glucose utilization in oral streptococci by low concentrations of fluoride. Caries Res. 11, 301 (1977)

KEMP, C.W.: Adenylate Energy Charge: A method for the determination of viable cell mass in dental plaque samples. J. Dent. Res. 58, Special Issue D, 2192 (1979)

KLOFAT, W., PICCIOLO, G., CHAPPELLE, E.W. and FREESE, E.: Production of adenosine triphosphate in normal cells and sporulation mutants of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 244, 3270 (1969)

KNUST, E.A., CHAPPELLE, E.W. and PICCIOLO, G.L.: A comparison of certain extracting agents for extraction of adenosine triphosphate (ATP) from microorganisms for use in the firefly luciferase assay. In: "Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence" (CHAPPELLE, E.W. and PICCIOLO, G.L., eds.) p. 27 (NASA, Publ. No. SP-388) National Aeronautics and Space Administration, Washington, D.C. (1975)

KÖNIG, K.G.: Kariesprophylaxe durch lokale Fluoridanwendung. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 77, 555 (1967)

KÖNIG, K.G.: Karies und Kariesprophylaxe. 2. Aufl. Goldmann München (1974)

KÖNIG, K.G.: Kariesreduktion durch fluoridierte Zahnpasten. Zahnärztl. Mittl. 67, 737 (1977a)

KÖNIG, K.G.: Karieshemmung durch fluoridhaltige Zahnpasten. Chem. Rundschau 30, 14 (1977b)

KOHLEMAINEN, S.: Luminometry; A sensitive technique in analytical chemistry and medical sciences. International Laboratory September/October 1979, 129 (1979)

LEE, C.C., HARRIS, R.F., WILLIAMS, J.D.H., ARMSTRONG, D.E. and SYERS, J.K.: Adenosine triphosphate in lake sediments. I. Determination. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, 82 (1971). II. Origin and significance. Ibid, 86 (1971)

LEHNINGER, A.L.: Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen. Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

LIPMANN, F.: Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. Adv. Enzymology 1, 99 (1941)

LÖE, H., THEILADE, E. and JENSEN, S.B.: Experimental gingivits in man. J. Periodont. 36, 177 (1965)

LUMAC Application Bulletin. Lumac System AG, BAsel 1979

LUMAC Lumacounter Modell 2080, Betriebsanleitung. Abimed Analysentechnik, Düsseldorf

LUNDIN, A. and THORE, A.: Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firelly bioluminescence in the assay of ATP. Anal. Biochem. 66, 47 (1975)

MARTHALER, T.M.: Karieshemmung durch Aminfluoridzahnpasten nach 7jähriger Studiendauer. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 78, 134 (1968)

MAURER, G.: Über den Adenosintriphosphatgehalt der Plaque: Bestimmung mit der Luciferin-Luziferase Biolumineszenz Reaktion. Med. Diss., Erlangen, 1981

MÜHLEMANN, H.R.: Die kariesprophylaktische Wirkung der Aminfluoride. Quintess. zahnärztl. Literatur 18, 1 (1967)

NETUSCHIL, L.: Mikroflora und Fissurenversiegelung. Kariesprophylaxe 3, 135 (1981)

NETUSCHIL, L. und SCHMALZ, G.: Lebendbestimmung kariogener Bakterien mittels Fluoresceindiacetat. Kariesprophylaxe 3, 75 (1981)

NEWBRUN, E.: "Cariology", Williams & Wilkins, Baltimore, S. 44 (1978)

NILSSON, L.: New rapid bioassay of gentamicin based on luziferase assay of extracellular ATP in bacterial cultures. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 14, 812 (1978)

OLSON, B.L., MC DONALD jr., J.L., STOOKEY, J.K.: The effect of lithium and fluoride upon in vitro plaque and bacterial growth. J. Dent. Research 58, 1428 (1979)

ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W., REYNIERS, J.A., TREXLER, P.C., WAGNER, M., GORDON, H.A. and LUCKEY, T.D.: Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. J. Dent. Research 33, 147 (1954)

PICCIOLO, G.L., DEMING, J.W., NIBLEY, D.A. and CHAPPELLE, E.W.: Characteristics of commercial instruments and reagents for luminescent assays. Methods in Enzymology, Vol. LVII, 43, 550 (1978)

RATEITSCHAK, K.H., RENGGLI, H.H. and MÜHLEMANN, H.R.: Parodontologie S. 20 (1975)

RIETHE, P.: Verhütung kariöser Läsionen, Initialstadium, De- und Remineralisationsvorgänge. Zahnärztl. Mitt. 10, 1124 (1982)

RIEDL, R.: Über den ATP-Gehalt von Streptococcus mutans-Zellen. Med. Diss. Erlangen (1981)

ROBERTON, A.M. and WOLFE, R.S.: Adenosine triphosphate pools in Methanobacterium. J. Bacteriol. Vol. 102, No. 1, 43 (1970)

ROBRISH, S.A., KEMP, C.W. and BOWEN, W.H.: Use of extractable adenosine triphosphate to estimate the viable cell mass in dental plaque samples obtained from monkeys. Appl. Environ. Microbiol. 35, 743 (1978)

ROBRISH, S.A., KEMP, W.C., CHOPP, D.E. and BOWEN, W.H.: Viable and total cell masses in dental plaque as measured by bioluminescence methods. Clin. Chem. 25, 1649 (1979)

SAXER, U.P.: Lokale Fluoridierung. In: "Individuelle orale Präventivmedizin". Fortb. Kurs Zahnärztl. Inst. Zürich 2./3. März 1978

SCHRAM, E.: Bioluminescence: Fundamental and practical aspects. Arch. Int. Physiol. Biochim. 81, 561 (1973)

SCHRAM, E.: Bioluminescence, Measurements: Fundamental aspects, analytical applications and prospects. In: "Proceedings of the International Symposium on liquid scintillation comtings. 20-22. Aug. 1973 Sydney" (STANLEY, P.E. and SCOGGINS, B.A., eds.) New York 1974

SCHUSTER, G.S., WHITFORD, G.M. and LANKFORD, M.T.: Relationship between fluoride resistance of Streptococcus mutans 6715 and medium pH. Caries Res. 15, 32 (1981)

SELIGER, H.H.: Applications of chemiluminescence. In: "Chemiluminescence and Bioluminescence" (CORMIER, M.J., HERCULES, D.M. and LEE, J., eds.) Plenum Press New York (1973)

SELIGER, H.H. and MC ELROY, W.D.: Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. Arch. Biochem. Biophys. 88, 136 (1960)

SHARPE, A.N., WOODROW, M.N. and JACKSON, A.K.: Adenosine triphosphate levels in foods contaminated by bacteria. J. appl. Bact. 33, 758 (1970)

SPIEGEL, S.J. and TIFFT jr., E.C.: Stability of reagents for use in an automated ATP bioluminescence assay system. Analyt. Biochem. 78, 586 (1977)

STREHLER, B.L. and TROTTER, J.R.: Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. Arch. Biochem. Biophys. 40, 28 (1952)

TAL, E., DIKSTEIN, S. and SULMAN, F.J.: ATP determination with the tricarb scintillation counter. Experimentia 20, 652 (1964)

THIBORDEAU, E.A. and MARQUIS, R.E.: Death of Streptococcus mutans SL-1 following growth in fluoridated medium. J. Dent. Research 59, 1987 (1980)

TIWARI, K.P. and PANDEY, A.: The influence of mutagenic chemicals on lactic acid fermentation by Lactobacillus bulgaricus AU. Zbl. Bakt. II. Abt. 134, 748 (1979)

WHITE, E.H., MC CAPRA, F., FIELD, J.F. and MC ELROY, W.D.: The structure and synthesis of firefly luciferin. J. Am. Chem. Soc. 83, 2402 (1961)

WIESMANN, E.: Medizinische Mikrobiologie. 4. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

WULFF, K.: Persönliche Mitteilungen 1982

YOON, N.A. and BERRY, C.W.: The antimicrobial effect of fluorides (acidulated phosphate, sodium and stannous) on Actinomyces viscosus. J. Dent. Research 58, 1824 (1979)

YOON, N.A. and NEWMAN, M.G.: Antimicrobial effect of fluorides on Bacteroides melaninogenicus subspecies and Bacteroides asaccharolyticus. J. Clin. Periodontol. 7, 489 (1980)

LEBENSLAUF

Ich wurde am 11. August 1958 als Sohn des Sonderschulpädagogen Heinz Steinke und seiner Ehefrau Lisa, geb. Möller, in Bad Hersfeld geboren.
Nach vierjähriger Grundschulzeit in der Südschule in Bad Hersfeld trat ich im Sommer 1968 in das Alexander v. Humboldt-Gymnasium zu Lauterbach ein, in dem ich das Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig im Juni 1977 ablegte.
Nach einjähriger Lehrzeit als Zahntechniker begann ich zum Wintersemester 1978/79 das Studium der Zahnmedizin in Tübingen. Die zahnärztliche Vorprüfung legte ich dort im März 1981 ab, die zahnärztliche Prüfung bestand ich am 14. 12. 1983.